



Conception et synthèse de nouveaux inhibiteurs de la kallicréine 7

Patomo Dominique Arama

► To cite this version:

Patomo Dominique Arama. Conception et synthèse de nouveaux inhibiteurs de la kallicréine 7. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONT3503 . tel-01306272

HAL Id: tel-01306272

<https://theses.hal.science/tel-01306272>

Submitted on 22 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale ED 459,
Sciences Chimiques Balard

Et de l'unité de recherche CNRS-UM-ENSCM, UMR 5247
(Institut des Biomolécules Max Mousseron)

Spécialité : **Ingénierie Moléculaire**

Présentée par **Mr. Patomo Dominique ARAMA**

CONCEPTION ET SYNTHÈSE DE NOUVEAUX INHIBITEURS DE LA KALLICRÉINE 7

Soutenue le 20 Novembre 2015 devant le jury composé de

Mr. CHAVIGNON Olivier Professeur, Université d'Auvergne Laboratoire de Chimie Organique, IMTV UMR 990 INSERM	Rapporteur
Mr. DOUMBIA Ousmane Professeur, Université des Sciences, des Techniques, et des Technologies de Bamako (USTTB) - Faculté de Pharmacie de Bamako	Examineur
Mme EL AMRI Chahrazade Professeur, Université Pierre et Marie Curie Laboratoire UR4-UPMC Vieillesse, Stress et Inflammation	Examineur
Mr. HAMZÉ Abdallah Maître de conférences, Université Paris-Sud Laboratoire Chimie Thérapeutique, BIOcis, UMR CNRS 8076	Rapporteur
Mr. LISOWSKI Vincent Professeur, Université de Montpellier Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247, CNRS-UM-ENSCM	Directeur de thèse
Mr. MARTINEZ Jean Professeur, Université de Montpellier Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247, CNRS-UM-ENSCM	Président du jury
Mr. MASURIER Nicolas Maître de conférences, Université de Montpellier Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247, CNRS-UM-ENSCM	Co-encadrant de thèse



DÉDICACES

À ma mère, à mon père, et à mon petit frère, *in memoriam* ! Partis trop tôt !

Je pense à vous au quotidien ; en ce jour, encore plus !

Au Professeur Jean Castel, *in memoriam* !

Je me rappellerai de votre souci constant du bien-être de l'autre, votre engagement pour les relations humaines. "*Apprendre à se connaître, pour savoir se comprendre*," telle est la devise de l'Association ICEO, dont vous avez été un des membres fondateurs.

« *N'attends pas que les événements arrivent comme tu le souhaites. Décide de vouloir ce qui arrive... Et tu seras heureux. »*
(*Epictetus, philosophe grec*)

Remerciements

Le travail de recherche décrit dans ce manuscrit, a été réalisé au sein du département des acides aminés, peptides et protéines (DAPP) de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM).

Je tiens tout d'abord à remercier le Gouvernement du Mali pour avoir financé cette formation malgré les difficultés sociopolitiques, sécuritaires, et économiques que connaît la république du Mali depuis 2012.

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude au Professeur Ousmane DOUMBIA, Pr. de Chimie Thérapeutique à la Faculté de Pharmacie de Bamako, pour avoir initié cette formation. Plus qu'un professeur, vous êtes pour moi un « père » attentionné ! Pour votre confiance, vos conseils, et votre soutien constant, MERCI !

Dans le cadre de ma formation en Master, et de mon parcours Doctoral, j'ai eu la chance, et le privilège de connaître des personnes auxquelles je voudrais rendre hommage en quelques lignes.

J'exprime ma sincère reconnaissance au Professeur Vincent LISOWSKI (mon Directeur de thèse), et au Docteur Nicolas MASURIER (mon Co-encadrant de thèse), pour avoir accepté de diriger ce travail.

Toute ma gratitude au Professeur Jean MARTINEZ, ancien Directeur de l'Institut des Biomolécules Max-Mousseron, Messieurs Pierre FULCRAND, Ludovic MAILLARD, Jean-Alain FEHRENTZ, Jean-François HERNANDEZ, Gilles SUBRA, madame Muriel AMBLARD, Séverine DENOYELLE, Laurent GAVARA (pour ses conseils avisés), Baptiste LEGRAND, et leurs collaborateurs pour m'avoir chaleureusement accueilli dans leurs locaux.

Merci à Pierre SANCHEZ, Aurélien LEBRUN, et Karine PARRA pour les analyses spectrométriques et spectroscopiques. Merci à Youssef BOUKCHAT, Bruno MAUREL, Luc BRUNEL [et famille pour la belle visite guidée de la ville de Nemausus (Nîmes)] ! Je remercie tous les autres permanents du DAPP.

Je voudrais associer à ces remerciements les camarades doctorants, et post-doctorants du laboratoire. Merci particulièrement à Jérémie CICCIONE, mon compagnon de rédaction, Mathieu MAINGOT, et à Cécile ECHALIER, pour les cours accélérés en informatique ! Merci aux Dr. Loic MATHIEU, Soultan Al HALIFA, Vincent MARTIN, Cindy PATINOTE, Coline PINESE, Saïd JEBORS et Lubomir VEZENKOV !

Je remercie tous les étudiants stagiaires qui ont participé à ce projet, pour leur gentillesse et leur sympathie : David Reyes, Jean-François Longévial, Isabelle Béquignon, Christina Lymperopoulou, Tom-Alexandre Strasbach, Clément Kotras.

Merci au Pr. Chahrazade EL AMRI et à Feryel SOUALMIA, pour la réalisation des études biochimiques. Merci à Roberta Aruta et à Eliana Scarlata pour le travail effectué avant mon arrivée.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur Pierre CHEVALLET et Annette CARNAC pour m'avoir fait découvrir les multiples richesses de la France sur le plan gastronomique et géographique, à travers les nombreuses invitations aux repas et voyages. Merci de votre soutien tout au long de cette formation. Merci à Samuel BRAU et à sa famille, pour les cours de natation.

Je remercie le Père Gérard BLAYAC et sa famille pour leur soutien, et pour les repas partagés avec la communauté estudiantine du Mali à Montpellier.

Je voudrais remercier la communauté malienne de Montpellier à travers l'association culturelle des Maliens de Montpellier (AMAM), aussi les associations "Espoir pour un enfant" et "Ensemble nous pouvons – An jèlen be se". Merci d'avoir rendu agréable mon séjour. J'exprime particulièrement ma reconnaissance à la famille Camara, pour avoir guidé mes premiers pas à Montpellier.

Merci au Professeur Yves PELISSIER et à l'association PharmaHumanitaire.

Puissent, tous mes amis en France, trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Que mes amis au Mali, les camarades du groupe Q, particulièrement Alain DIONDO, Mamoudou GANA, et Richard TOLOFOUDJE, trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude, pour leur bienveillance à l'égard de ma famille.

Je tiens à remercier ma belle-famille pour sa compréhension. Vous n'avez ménagé aucun effort pour être à l'écoute de ma famille, durant cette longue absence. Trouvez ici l'expression de ma très profonde gratitude.

Je voudrais remercier toute ma famille, grande à l'africaine : mes tantes, oncles, sœurs, cousins, et cousines, pour leur soutien et leurs bénédictions.

Je remercie profondément, et sincèrement mon épouse Fatoumata Traoré pour son amour, sa patience, et sa compréhension. Tu as accepté mon absence pendant ces années, et tu me rappelais souvent en plaisantant, je cite : « Cela fera bientôt 1 an, 2 ans, ..., 5 ans que tu m'as abandonnée. » Merci d'avoir supporté cette absence, qui nous permet d'être encore plus proches. MERCI !

Enfin, je voudrais exprimer ma gratitude à l'ensemble des personnes qui, de loin ou de près, ont contribué au bon déroulement de cette thèse.

Hommages aux membres du Jury

A mon directeur de thèse, le Pr. Vincent LISOWSKI

A mon co-encadrant de thèse, le Dr. Nicolas MASURIER

Merci d'avoir accepté de superviser ce travail. Pour les enseignements reçus, les conseils et pour votre disponibilité. J'ai su apprécier votre savoir-faire et votre savoir-être. Merci pour votre patience ! Puissent, beaucoup d'autres étudiants, bénéficier de votre rigueur, et de vos compétences scientifiques.

A mes rapporteurs :

- Pr. Olivier CHAVIGNON*
- Dr. Abdallah HAMZÉ*

Merci d'avoir accepté d'évaluer ce travail, malgré vos multiples occupations.

A mes examinateurs :

- Pr. Chahrazade EL AMRI*
- Pr. Ousmane DOUMBIA*
- Pr. Jean MARTINEZ*

Merci de l'honneur que vous nous faites, de siéger dans ce Jury, malgré vos agendas très chargés.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Enzymes – Protéines – Substrats – Lignées cellulaires, et termes associés

α 2M (A2M)	alpha-2 macroglobuline
ACPT	testicular acid phosphatase gene
ADN	acide désoxyribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
EC ₅₀	concentration efficace à 50%
HaCat	cellules péritumorales des kératinocytes, issues de la peau humaine
HtrA2	high temperature requirement A2
HEK-293	cellules embryonnaires de rein humain
HeLa	cellules cancéreuses issues du cancer du col de l'utérus métastaté
IC ₅₀	concentration inhibitrice à 50%
K_i	constante d'inhibition
KLK	kallicréine
K_m	constante de Michaelis-Menten
LEKTI	lympho-epithelial Kazal-type inhibitor
MBP	myelin basic protein
MMP	métallo-protéase de matrice
PC-3	cellules cancéreuses du cancer de la prostate
PDB	protein data bank
PMS	phenazine methosulfate
PSA	antigène spécifique de la prostate
Serpin	serine protease inhibitor
SIGLEC9	sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 9 gene
Spink 5	serine protease inhibitor Kazal-type 5
SW-620	cellules cancéreuses du colon
TGF β	transforming growth factor β
V_{max}	vitesse maximale de la réaction enzymatique

Produits – Réactifs – Solvants

ACN	acétonitrile
AcOEt	acétate d'éthyle
Boc-AA-OH	acide aminé dont la fonction amine est protégée par un groupement <i>tert</i> -butyloxycarbonyle
CTAB	bromure de cetyltriméthyle ammonium ou bromure d'hexadécyltriméthyle ammonium (surfactant cationique)
CDCl ₃	chloroforme deutéré
CHCl ₃	chloroforme
DCE	1,2-dichloroéthane
DCM	dichlorométhane
DMA	<i>N,N</i> -diméthylacétamide
DME	diméthoxyéthane
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide

DMSO	diméthylsulfoxyde
DMSO- <i>d</i> ₆	diméthylsulfoxyde deutéré ou hexadeutérodiméthylsulfoxyde
EDCI	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EtOH	éthanol
HOBt	hydroxybenzotriazole
IP	imidazo[1,2- <i>a</i>]pyridine
MeOH	méthanol
PivOH	acide pivalique
<i>t</i> -BuOH	<i>tert</i> -butanol
TFA	acide trifluoroacétique
TFAA	anhydride trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane
XTT	2,3-Bis-(2-Méthoxy-4-Nitro-5-sulfophényl)-2H-Tétrazolium-5-Carboxanilide

Codes à trois lettres des acides aminés

Ala	Alanine	Lys	Lysine
Arg	Arginine	Met	Méthionine
Asn	Asparagine	Nle	Norleucine
Asp	Acide aspartique	Phe	Phénylalanine
Cys	Cystéine	Pro	Proline
Glu	Acide glutamique	Trp	Tryptophane
Gly	Glycine	Thr	Thréonine
His	Histidine	Ser	Sérine
Ile	Isoleucine	Tyr	Tyrosine
Leu	Leucine	Val	Valine

Techniques d'analyse et abréviations diverses

Å	Angström
°C	degré Celsius
$[\alpha]_D^{20}$	pouvoir rotatoire spécifique mesuré pour la raie D du sodium (589 nm) à 20°C
δ	déplacement chimique (en ppm)
Ac	acétyle
aq.	solution aqueuse
<i>al.</i>	collaborateurs
AMC	7-amino-4-méthyle-coumarine
Ar	aryle
AUC	aire sous la courbe
Bn	benzyle
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyle
Bu	<i>n</i> -butyle
Cat.	catalyseur
Cbz	carboxybenzyle ou benzyloxycarbonyle
CCM	chromatographie sur couche mince
Da	dalton

déc.	décomposition
ee	excès énantiomérique
éq. (équiv.)	équivalent(s)
ESI(+)	ionisation par électro-nébulisation (en mode positif)
Et	éthyle
FT-IR	spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
g	gramme
H (h)	heure
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HPLC	chromatographie liquide à haute pression
HRMS	spectrométrie de masse à haute résolution
<i>i</i> Bu	<i>iso</i> -butyle
<i>i</i> Pr	<i>iso</i> -propyle
JMV	code d'identification des produits de synthèse enregistrés dans la base de données du DAPP
kDa	kilodalton
LC-MS	spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide à haute pression
M	molaire (<i>i.e.</i> en moles par litre)
Me	méthyle
mg	milligramme
MHz	mégahertz
min	minute
mL	millilitre
MM	masse moléculaire
MS	spectrométrie de masse
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
pf	point de fusion
Ph	phényle
ppm	partie par million
Rdt	rendement
RMN	résonance magnétique nucléaire
Sat.	solution saturée (ici, aqueuse)
SET	single-electron transfer
Suc	succinyle
TA(RT)	température ambiante
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -butyle
Tr	temps de rétention
Ts	tosyle

Sommaire

INTRODUCTION	10
PARTIE I - ÉTAT DE L'ART SUR LES PROTÉASES	12
I. LES PROTÉASES, UNE GRANDE FAMILLE D'ENZYMES	14
I.1. Classification des protéases	15
I.1.1. Classification basée sur le site de clivage.....	15
I.1.2. Classification selon le mécanisme d'action.....	16
I.1.3. Classification selon le système MEROPS.....	17
I.2. Mécanisme d'action catalytique des protéases	19
I.2.1. Liaison des protéases au substrat.....	19
I.2.1.1. Notion de site actif.....	19
I.2.1.2. Interactions protéase-substrat	19
I.2.2. Mode d'action proprement dit	20
I.3. Régulation de l'activité des protéases	21
I.3.1. Modulation de la quantité d'une enzyme	21
I.3.1.1. Action sur la synthèse et la dégradation	21
I.3.1.2. Compartimentation	22
I.3.2. Modulation de l'activité enzymatique	22
I.3.2.1. Régulation par clivage protéolytique.....	22
I.3.2.2. Régulation allostérique	23
I.3.2.3. Régulation par modifications covalentes.....	24
I.3.2.4. Régulation par association à des inhibiteurs endogènes.....	25
I.4. Intérêt des protéases	26
II. LES PROTÉASES A SÉRINE	28
II.1. Classification des protéases à sérine	29
II.2. Mécanisme d'action catalytique	30
II.3. Contrôle de l'activité des protéases à sérine	33

III.	LES KALLICRÉINES	34
III.1.	Système kallibréine-kininogène-kinines.....	34
III.2.	Les kallibréines tissulaires.....	37
III.2.1.	Répartition tissulaire	38
III.2.2.	Propriétés biologiques et intérêts en thérapeutique	38
III.2.2.1.	Rôles des « kallibréines classiques ».....	38
III.2.2.2.	Rôles dans l'amélogénèse	39
III.2.2.3.	Rôles dans la physiologie de la peau.....	39
III.2.2.4.	Rôles dans le système nerveux.....	39
III.2.2.5.	Implications des KKK dans le cancer.....	40
III.2.3.	Mode d'action des kallibréines tissulaires	42
III.2.4.	Régulation de l'activité des KKK tissulaires	42
III.2.4.1.	Inhibiteurs naturels.....	43
III.2.4.2.	Inhibiteurs synthétiques des KKK tissulaires	52
IV.	LA KALLICRÉINE HUMAINE 7.....	56
IV.1.	La peau	56
IV.2.	Fonctions physiologiques de la KKK7	57
IV.3.	La KKK7 en tant que cible thérapeutique	58
IV.3.1.	Implication de la KKK7 dans les dermatoses	58
IV.3.1.1.	Psoriasis	59
IV.3.1.2.	Syndrome de Netherton	60
IV.3.2.	Implication de la KKK7 dans les cancers	61
IV.4.	Caractéristiques biochimiques de la KKK7.....	61
IV.5.	Inhibiteurs de la KKK7	62
IV.5.1.	Inhibiteurs naturels	63
IV.5.2.	Inhibiteurs de type chlorométhyl-cétone	65
IV.5.3.	Inhibiteurs de type « petites molécules ».....	66
PARTIE II -	ÉTAT DE L'ART SUR LE CYCLE IMIDAZO[1,2- <i>a</i>]PYRIDINE	71
I.	INTÉRÊT DU NOYAU « IP » EN THÉRAPEUTIQUE	71
I.1.	Molécules bioactives comportant un noyau IP	72

I.2.	Dérivés de l'IP comme inhibiteurs enzymatiques	74
I.2.1.	Dérivés de l'IP comme inhibiteurs de protéines sérine/thréonine-Kinases..	74
I.2.2.	Dérivés de l'IP comme inhibiteurs de fusion du Virus Respiratoire Syncytial (VRS)	77
II.	ACCÈS AU NOYAU IP.....	78
II.1.	Réactions de condensation.....	78
II.1.1.	Synthèse de dérivés imidazo[1,2- <i>a</i>]pyridiniques à partir des α -halogénocarbonyles	79
II.1.2.	Synthèse de dérivés imidazo[1,2- <i>a</i>]pyridiniques à partir des α -bromo- β -cétoesters.	80
II.1.3.	Synthèse de dérivés imidazo[1,2- <i>a</i>]pyridiniques à partir des α -diazocétones	81
II.2.	Réactions multi-composants (MCR)	82
II.3.	Réactions catalysées par des métaux	87
II.3.1.	Synthèse de dérivés imidazo[1,2- <i>a</i>]pyridiniques à partir de pyridines <i>N</i> -oxydes et d'alcyne	87
II.3.2.	Synthèse de dérivés imidazo[1,2- <i>a</i>]pyridiniques à l'aide de nitrooléfines .	89
II.4.	Synthèse des dérivés 2-aminoimidazo[1,2- <i>a</i>]pyridiniques	92
II.4.1.	Synthèse de dérivés imidazo[1,2- <i>a</i>]pyridiniques à partir de 2-(1,2-dihydro-2-iminopyridin-1-yl)acétamides.....	92
II.4.2.	Synthèse de dérivés 2-amino-IP par réarrangement de Curtius	93
III.	Réactivité du cycle imidazo[1,2- <i>a</i>]pyridine	94
III.1.	Réactions de substitution nucléophile	95
III.1.1.	Substitution nucléophile en position 5.....	95
III.1.2.	Amination en position 2.....	96
III.2.	Réactions de substitution électrophile	97
III.2.1.	Nitration du noyau IP	97
III.2.2.	Halogénéation.....	98
III.2.3.	Réactions de métallation.....	102
III.2.4.	Alkylation du noyau IP	107

III.2.4.1. Hydroxyméthylation	108
III.2.4.2. Réaction de Mannich.....	108
III.2.4.3. Réaction d'aza-Friedel-Crafts	109
III.2.5. Acylation du noyau IP	111
III.3. Travaux antérieurs au sein du laboratoire	114
PARTIE III - TRAVAUX PERSONNELS	118
I. PRÉSENTATION DU PROJET	118
II. SYNTHÈSE D'ANALOGUES IP-DIAZÉPINIQUES	121
II.1. Synthèse de la 2-aminoimidazo[1,2- <i>a</i>]pyridine 4.....	121
II.2. Synthèse des dérivés C-3 acylés 6	124
II.3. Étude de la série 1 : dérivés "urée"	127
II.3.1. Étude de la cyclisation	128
II.3.2. Étude de l'activité enzymatique	131
II.4. Étude de la série 2 : analogues du JMV4967 diversement fonctionnalisés	132
II.4.1. Étude de la position 2	133
II.4.1.1. Obtention des composés	134
II.4.1.2. Étude de l'activité enzymatique	136
II.4.2. Étude de la position 4	143
II.4.2.1. Synthèse des composés.....	143
II.4.2.2. Étude de l'activité enzymatique des composés	147
II.4.3. Étude des positions 3 et 5	148
II.4.3.1. Synthèse du composé 16	149
II.4.3.2. Synthèse du composé 17	152
II.4.3.3. Étude de l'activité enzymatique	154
II.5. Étude de la série 3 : dérivés "amides"	154
II.5.1. Synthèse des composés	155
II.5.2. Étude de la cyclisation des dérivés amides	157
II.5.3. Étude de l'activité enzymatique	162
II.6. Conclusion générale des études de RSA.....	163

II.7. Étude de la cytotoxicité des composés	164
III. ÉTUDE DES DERIVES QUINAZOLINONES	167
III.1. Synthèse des dérivés quinazolinones.....	168
III.1.1. Synthèse de la 2-(chlorométhyl)-3-arylquinazolin-4-one substituée.....	168
III.1.1.1. Stratégie A.....	169
III.1.1.2. Stratégie B	170
III.1.2. Obtention des dérivés quinazolinones cibles	173
III.1.2.1. Substitution des quinazolinones	174
III.1.2.2. Réduction des dérivés nitrés 36.....	177
III.1.2.3. Méthylation du <i>N</i> -1 benzimidazolique.....	179
III.1.2.4. Synthèse du dérivé sulfoxyde.....	180
III.2. Étude de l'activité enzymatique des composés	182
IV. ÉTUDE DE LA SYNTHÈSE DE DERIVES IP-[1,3]DIAZEPINES <i>VIA</i> L'ADDITION DE MICHAEL	186
IV.1. Étude de la réaction de nitro-Michael sur la 2-aminoIP.....	187
IV.1.1. Synthèse des dérivés nitroalcènes.....	190
IV.1.2. Réduction des composés nitrés.....	192
IV.1.3. Étude de la cyclisation de la diamine 54a en diazépine et détermination de l'activité enzymatique	193
IV.2. Étude de l'induction de chiralité lors de la réaction de nitro-Michael	194
IV.2.1. Choix des catalyseurs	195
IV.2.2. Synthèse des catalyseurs.....	198
IV.2.3. Étude de l'addition de nitro-Michael.....	200
V. ÉTUDE POUR LA SYNTHÈSE DES DERIVES INDOLODIAZEPINONES .	203
V.1. Étude de la synthèse du 2-amino-indole.....	205
V.2. Étude de l'acylation du dérivé 2-amino-indole	210
V.3. Étude de la cyclisation de Pictet-Spengler	212
V.3.1. Étude de la cyclisation à partir du dérivé protégé.....	214
V.3.2. Étude de la cyclisation à partir du dérivé amine libre.....	215
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	218

PARTIE EXPÉRIMENTALE	221
VI. CONDITIONS EXPERIMENTALES GENERALES	221
VII. Protocoles expérimentaux	222
VII.1. Synthèse des composés	222
VII.2. Étude biochimique et de la cytotoxicité.....	289
VII.2.1. Enzymes et tests d'inhibition de l'activité enzymatique	290
VII.2.2. Mécanismes d'inhibition	290
VII.2.3. Expériences de docking moléculaire	291
VII.2.4. Culture cellulaire et test de cytotoxicité.....	291
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	292

INTRODUCTION

Les kallikréines (KLKs) tissulaires humaines sont des protéases à sérine « (chymo)trypsine-like » impliquées dans divers processus physiologiques. Parmi les 15 isoformes connues dans la littérature, la kallikréine 7 (KLK7) est particulièrement impliquée dans les processus de desquamation. La dérégulation de cette enzyme est associée à diverses atteintes dermatologiques, telles que le psoriasis ou la maladie de Netherton. Cette maladie, qui correspond à une ichtyose sévère du nouveau né, est actuellement incurable. Elle est due à une mutation génétique du LEKTI-1, inhibiteur physiologique de protéases, dont la KLK7. Par ailleurs, il est également admis que la KLK7 participe à l'invasion tumorale et à la progression du cancer de la prostate, des ovaires, et du pancréas, du fait de sa capacité à dégrader des protéines de la matrice extracellulaire. Le cancer de la prostate, qui demeure un problème de santé publique, est la deuxième cause de décès liée au cancer en France et aux Etats-Unis. L'utilisation d'inhibiteurs de la KLK7 pourrait donc constituer une approche prometteuse pour le traitement de certaines atteintes dermatologiques, et pour lutter contre la dissémination métastatique.

De nombreux travaux ont été effectués, depuis deux décennies, sur la synthèse d'inhibiteurs synthétiques de la KLK7. Toutefois, la plupart des molécules développées à ce jour, présentent une sélectivité insuffisante, et/ou ne possèdent pas de propriétés physicochimiques adaptées à une utilisation *in vivo*.

Dans le cadre d'une collaboration entre notre laboratoire et l'équipe du Dr. Chahrazade El Amri (UPMC, Paris), une évaluation de l'activité pharmacologique d'une librairie de composés hétérocycliques originaux a permis de mettre en évidence un effet inhibiteur modéré envers la KLK7. Ces composés possèdent un cycle 1,3-diazépinone fusionné au motif imidazo-[1,2-*a*]pyridine. C'est dans l'optique de synthétiser des inhibiteurs réversibles, sélectifs et plus puissants vis-à-vis de la KLK7, que s'inscrit ce projet de thèse.

Ce manuscrit est divisé en trois grandes parties. La première partie du document fait un état de l'art sur les protéases, en rappelant brièvement, leurs fonctions physiologiques, leur classification, et les différents modes de régulation de leur activité enzymatique. Cette partie détaille particulièrement les connaissances actuelles sur la KLK7, où sont rappelés les caractéristiques biochimiques de cette protéase et les travaux effectués à ce jour, pour identifier les molécules capables de moduler son action.

Dans la deuxième partie, un état de l'art est fait sur le cycle imidazo[1,2-*a*]pyridine. Les voies de synthèse et la réactivité de cet hétérocycle y sont décrites.

La troisième partie du manuscrit est consacrée aux travaux personnels effectués dans le cadre de ce projet. Les travaux menés à ce titre, s'articulent autour de trois axes principaux. En premier lieu, la pharmacomodulation de dérivés pyrido-imidazodiazépinones est présentée. Dans un second temps, la synthèse et l'activité d'une seconde série de composés, dérivés de quinazolinones, seront discutées. Enfin, les travaux menés autour de la réactivité de la 2-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridine et du 2-amino-indole seront exposés.

Enfin, une partie expérimentale détaille l'ensemble des manipulations effectuées au cours de ce travail.

PARTIE I - ÉTAT DE L'ART SUR LES PROTÉASES

L'une des conditions fondamentales de la vie est la capacité de l'organisme à catalyser les réactions chimiques de façon efficace et sélective. De nombreux processus biologiques ont lieu dans des conditions « douces », peu propices à leur déroulement et à des vitesses compatibles avec la vie. Ces réactions sont rendues possibles grâce à une catalyse enzymatique. La plupart des réactions biochimiques sont ainsi catalysées par des enzymes. Presque toutes les enzymes sont des protéines. Ce sont des biocatalyseurs qui peuvent accélérer la vitesse d'une réaction, d'un facteur 10^5 à 10^{17} , sans affecter l'équilibre de la réaction.

Une réaction enzymatique simple peut s'écrire :



E, S et P représentent respectivement l'enzyme, le substrat, et le produit ;
ES : complexe enzyme-substrat.

Le complexe enzyme-substrat formé au cours de la réaction enzymatique est appelé complexe de Michaelis. Sa formation entraîne un abaissement de l'énergie d'activation du substrat, et conduit donc à l'accélération de la réaction. L'énergie d'activation est l'énergie libre que le substrat doit absorber afin que ses liaisons soient rompues. Elle reflète la vitesse de la réaction : plus l'énergie d'activation est élevée, plus la réaction est lente (Figure I- 1).

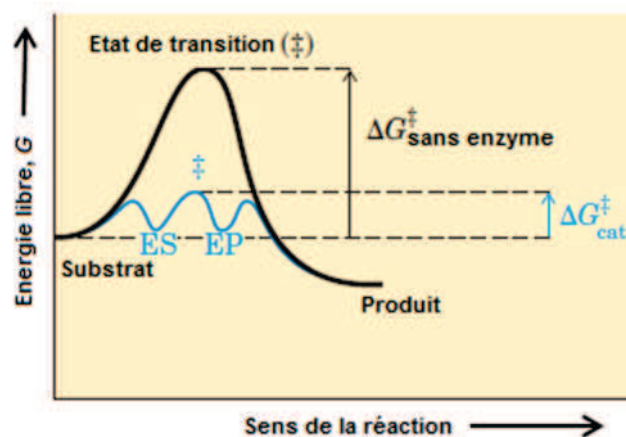


Figure I- 1 : Diagramme comparatif des réactions catalysées ou non par une enzyme

En outre, l'enzyme stabilise ce qu'on appelle l'état de transition. En effet, la formation du complexe enzyme-substrat qui est la première étape de la réaction enzymatique, conduit à un intermédiaire instable dans lequel les liaisons sont plus faciles à rompre que dans le substrat initial. Cet état intermédiaire, est un autre paramètre essentiel en catalyse enzymatique.¹

Les enzymes sont généralement spécifiques d'un substrat, elles agissent en faible concentration, et restent inchangées au cours de la réaction. Certaines enzymes nécessitent pour leur activité des groupes chimiques autres que les résidus de leurs acides aminés. Ces composants chimiques additionnels appelés cofacteurs peuvent être un ou plusieurs ions inorganiques (Cu^{2+} , Zn^{2+} , etc.), un complexe organique (vitamines) ou une molécule (métallo)organique appelée coenzyme (NAD/NADH⁺).

Il existe plusieurs classes d'enzymes en fonction du type de réaction qu'elles catalysent. Une classification a été établie en 1961 par la commission des enzymes de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire. Selon cette commission, l'appellation officielle d'une enzyme est EC suivie d'une série de 4 chiffres séparés par un point (*EC : Enzyme Commission*). Chaque chiffre donne une information qui permet d'identifier l'enzyme parmi les nombreuses enzymes connues (Encadré I- 1).²

EC x₁. x₂. x₃. x₄	
X ₁	: varie de 1 à 6 ; désigne la classe de l'enzyme et indique le type de réaction catalysée
X ₂	: désigne la sous-classe et indique sur quel groupement ou liaison agit l'enzyme (substrat général)
X ₃	: désigne la sous-sous-classe de l'enzyme et donne des informations complémentaires sur sa cible (substrat spécifique)
X ₄	: indique le numéro d'ordre de l'enzyme dans la série

Encadré I- 1 : Dénomination officielle d'une enzyme

La commission des enzymes a défini six grandes classes correspondant chacune à un type de réaction chimique catalysée par toutes les enzymes du groupe. Ainsi, les hydrolases (groupe auquel appartiennent les protéases) réalisent toutes une coupure hydrolytique de liaisons chimiques variées. Par exemple, les liaisons « ester » sont hydrolysées par des estérases, tandis que les liaisons peptidiques sont clivées par des peptidases ou protéases. Les six grandes classes d'enzymes et leurs caractéristiques fonctionnelles sont présentées dans le Tableau I- 1.

N°	Nom	Caractéristiques fonctionnelles
1	Oxydoréductases	Oxydo-réduction par transfert d'ions H^+ ou d'électrons
2	Transférases	Transfert de groupement fonctionnel d'une molécule (donneur) à une autre (accepteur)
3	Hydrolases	Hydrolyse de liaisons chimiques
4	Lyases	Formation de doubles liaisons ou de cycles par rupture de différentes liaisons chimiques
5	Isomérases	Isomérisation de liaisons par réarrangement de la molécule
6	Ligases ou synthases	Formation de nouvelles liaisons par la jonction de deux molécules

Tableau I- 1 : Grandes classes d'enzymes et leurs fonctions

Par exemple, la chymotrypsine, une protéase digestive synthétisée au niveau du pancréas, est officiellement désignée par le numéro EC 3.4.21.1 (Encadré I- 2).

<p style="text-align: center;"><u>EC 3. 4. 21. 1</u></p> <p>3 : classe des hydrolases</p> <p>4 : sous-classe des peptidases (action sur les liaisons peptidiques)</p> <p>21 : sous-sous classe des Sérine-endoréptidases</p> <p>1 : numéro de série</p>
--

Encadré I- 2 : Dénomination officielle de la chymotrypsine

Dans ce document, nous nous limiterons aux protéases, une grande famille d'enzymes appartenant à la classe des hydrolases. Nous nous intéresserons ensuite plus spécifiquement aux kallicréines, et en particulier à la kallicréine 7.

I. LES PROTÉASES, UNE GRANDE FAMILLE D'ENZYMES

Les protéases sont des enzymes ubiquitaires qui catalysent la coupure des liaisons peptidiques établies entre les acides aminés des protéines. Citons comme exemples, la pepsine du suc gastrique, les collagénases de la matrice extracellulaire, la trypsine et la chymotrypsine du pancréas. Plusieurs noms ont été utilisés pour désigner les enzymes qui assurent la dégradation des liens peptidiques : protéinases, protéases, peptidases ou enzymes protéolytiques. Le processus irréversible de clivage des protéines, connu sous le nom de protéolyse, joue d'importants rôles physiologiques dans de nombreux mécanismes cellulaires.³ Dans le génome humain, on estime que les protéases représentent près de 2% des gènes, formant ainsi la plus grande famille d'enzymes humaines, avec au moins 566 protéines.⁴ Toutes les protéases catalysent l'hydrolyse d'un lien peptidique mais utilisent divers mécanismes pour y parvenir. Certaines protéases

catalysent l'hydrolyse par la formation transitoire d'un lien covalent avec le substrat : c'est le cas des protéases à sérine, à cystéine, et à thréonine. Ce type de mécanisme est appelé catalyse « covalente ». D'autres protéases procèdent à l'hydrolyse du lien peptidique selon une catalyse dite « acide-base », sans formation de lien covalent : c'est le cas des protéases à acide aspartique et des métallo-protéases. Ces deux modes de catalyse seront décrits en détail dans la section I.2.2.

L'activité protéolytique des protéases implique l'utilisation d'une molécule d'eau, ce qui permet de les classer parmi les hydrolases.

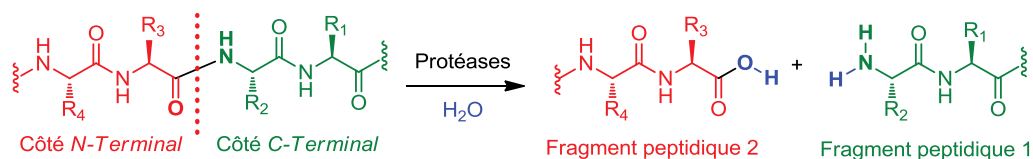


Schéma I- 1 : Hydrolyse d'une liaison peptidique par les protéases

I.1. Classification des protéases

Dans la nomenclature internationale officielle des enzymes, les protéases représentent la catégorie EC 3.4 où le chiffre « 3 » fait référence aux hydrolases, et le « 4 » aux peptidases. Trois critères majeurs sont utilisés pour distinguer les protéases : le site d'action, le mécanisme d'action, et la structure tertiaire de la protéine.

I.1.1. Classification basée sur le site de clivage

Sur la base des critères de spécificité de clivage, les protéases sont classées en deux grands groupes : les exopeptidases et les endopeptidases.

Les exopeptidases clivent les peptides aux extrémités de la chaîne peptidique, libérant ainsi le premier ou le dernier acide aminé de la séquence. Une coupure de la seconde ou pénultième liaison est également possible. Parmi les exopeptidases, on distingue les aminopeptidases et les carboxypeptidases. Les aminopeptidases libèrent des acides aminés de l'extrémité *N*-terminale d'une protéine, tandis que les carboxypeptidases coupent entre l'avant dernier et le dernier acide aminé de l'extrémité *C*-terminale de la protéine.

Les endopeptidases clivent à l'intérieur des chaînes peptidiques en libérant des séquences peptidiques plus courtes (Figure I- 2).

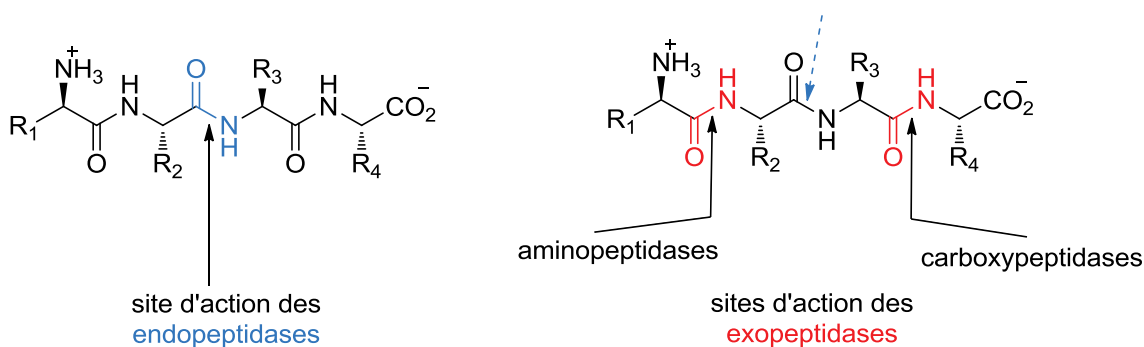


Figure I- 2 : Sites d'action des endopeptidases et des exopeptidases
(La possibilité d'une hydrolyse de la seconde ou pénultième liaison est indiquée par une flèche en pointillé (bleue))

Selon la nature du résidu d'acide aminé du site actif impliqué dans la catalyse de la réaction, les protéases peuvent être regroupées en grandes familles mécanistiques.

I.1.2. Classification selon le mécanisme d'action

On distingue cinq familles majeures de protéases, et un groupe constitué par des protéases pour lesquelles le mécanisme catalytique est inconnu ou non classifié à ce jour :

- Les protéases à aspartate : elles agissent à pH acide et possèdent deux acides aspartiques dans leur site actif.
- Les protéases à serine : leur activité catalytique dépend de la sérine. Elles utilisent le groupement hydroxyle de la sérine comme nucléophile nécessaire à la catalyse.
- Les protéases à cystéine : elles possèdent une cystéine dans leur site actif. Dans ce cas, le rôle du nucléophile est joué par le groupement thiol de la cystéine.
- Les protéases à thréonine : ce sont des enzymes dont le résidu d'acide aminé impliqué dans la catalyse est une thréonine. Le rôle de nucléophile est joué par l'alcool secondaire de la thréonine.
- Les métallo-protéases : elles possèdent dans leur site actif un ion métallique, qui participe à la catalyse.

Les protéases à cystéine, les protéases à serine et les métallo-protéases sont très répandues (160 à 200 membres identifiés chez l'homme) tandis que les protéases à aspartate et à thréonine sont plus rares (25 et 30 membres respectivement).⁵

Le Tableau I- 2 présente les cinq familles majeures de protéases avec quelques représentants pour chacune.

N°	Familles	Exemples
1	Protéases à Sérine	Trypsine, Chymotrypsine, Thrombine, Cathepsine A, Subtilisine, Kallicréine.
2	Protéases à Cystéine	Caspases, Papaïne, Cathepsines B, C, F, H, K.
3	Protéases à Aspartate ou protéases acides	Pepsines, Cathepsines D, E, Rénines.
4	Métallo-protéases	Collagénases, Gélatinases, Thermolysine, Matrilysine.
5	Protéases à Thréonine ou Thréonine-asparaginases	Taspase 1, Complexe 20S du protéasome

Tableau I- 2 : Les grandes familles de protéases

En 1993, N. D. Rawlings et A. J. Barrett ont introduit un troisième critère, à savoir la structure tertiaire de la protéine, pour proposer une classification moderne des protéases. Ce système de classification est appelé système MEROPS.⁶

I.1.3. Classification selon le système MEROPS

Le système MEROPS est un système hiérarchique accessible en ligne⁷, dans lequel les peptidases sont individuellement reconnues sur la base de leur structure. Elles sont ensuite regroupées dans des familles autour d'un membre fondateur ou "exemple type". Cette classification repose sur les principes de la phylogénie, étude des relations de parenté des êtres vivants. Une peptidase est ainsi assimilée à une famille quand l'enchaînement de ses acides aminés, montre une homologie de séquence par rapport à l'exemple type, ou à un autre membre existant de la famille.

Les familles homologues sont assemblées pour former un clan. Un clan correspond à un groupe de familles qui dérivent de manière évidente d'un ancêtre commun. Les similitudes dans les structures cristallines tertiaires, ou un ordre identique des résidus catalytiques dans la séquence linéaire protéique associé à des séquences similaires d'acides aminés autour des résidus catalytiques, permettent de mettre en évidence la filiation entre les protéases. De plus, certaines familles sont subdivisées en sous-familles et certains clans en sous-clans.^{8,9}

Les clans sont définis par des lettres en fonction des résidus catalytiques ou des acides aminés de séquence conservés autour des résidus catalytiques. Chaque clan est identifié par deux lettres, la première représente le type de résidu catalytique des familles du clan (A, C, M, S, T, U) et la deuxième, une lettre de série. On distinguera ainsi les clans des aspartique-, cystéine-, métallo-, sérine-, thréonine-peptidases, respectivement pour le clan A-, C-, M-, S-, T- et le clan U-

qui regroupe les peptidases non classifiées (Exemple : AA, AC, AD, CA, MA, SB, SC, etc.). Une lettre P est utilisée pour désigner un clan regroupant plusieurs familles de différents types de résidus catalytiques (par exemple sérine, cystéine et thréonine), bien qu'elles soient issues d'un ancêtre commun. La lettre P est suivie également d'une lettre de série (Exemple : PA, PB, etc.). Par ailleurs, chaque famille est identifiée par une lettre désignant le type de résidu catalytique, suivie d'un numéro de série (Exemple : A1, A2, S1, S2, etc.).

La Figure I- 3 illustre les différents niveaux de classification en prenant l'exemple du clan PA. La lettre P est utilisée pour identifier ce clan, car il contient à la fois les cystéine-peptidases et les sérine-peptidases. La lettre A représente la série (ne correspond pas à un résidu catalytique).⁷ Ce clan est constitué de deux sous-clans. Le sous-clan PA(C) contient plusieurs familles et sous-familles de protéases à cystéine, et le sous-clan PA(S) regroupe plusieurs familles et sous-familles de protéases à sérine. Ainsi, la kallicréine 7 appartient au clan PA, au sous-clan PA(S), à la famille S1, à la sous-famille S1A, et est enregistrée sous le numéro identifiant (*MEROPS* ID) S01.300.

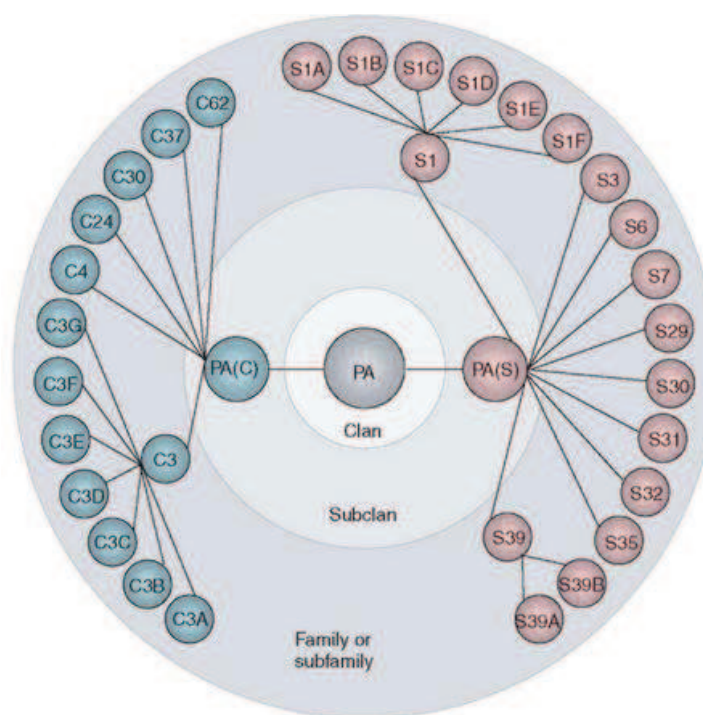


Figure I- 3 : Clan PA dans le système MEROPS¹⁰

Les acides aminés impliqués dans le site actif permettent non seulement de distinguer les différentes classes de protéases mais aussi, de déterminer le mécanisme par lequel elles effectuent le clivage d'un lien peptidique.

I.2. Mécanisme d'action catalytique des protéases

L'une des conditions requises pour que les protéases exercent leur activité catalytique, est la spécificité de reconnaissance des substrats sur lesquels elles agissent. Dans un souci de compréhension de l'association protéase-substrat, nous rappelons ci-après, la notion de site actif et les interactions possibles entre une protéase et son substrat.

I.2.1. Liaison des protéases au substrat

I.2.1.1. Notion de site actif

Les protéases sont capables de se replier pour adopter une conformation dans laquelle elles acquièrent leur pouvoir catalytique. Ce repliement aboutit à une structure tridimensionnelle fonctionnelle de la protéase. Cela permet à une région de la protéase d'adopter un agencement spatial qui permet la reconnaissance du substrat. Cette région particulière de la protéase qui interagit avec le substrat, est appelée site actif ou site catalytique. Le site actif est constitué d'un petit nombre d'acides aminés qui ne sont généralement pas contigus dans l'enchaînement de la chaîne polypeptidique. La spécificité de l'association protéase-substrat va essentiellement dépendre de la nature des acides aminés du substrat, à proximité du site de coupure par la protéase (sous-sites S1, S1', S2, S2', etc.).

I.2.1.2. Interactions protéase-substrat

Le positionnement des atomes dans le site actif est basé sur le principe de la complémentarité stérique et électronique entre la protéase, et le substrat. En effet, le site de liaison est généralement complémentaire du substrat en termes de taille, forme, charge, caractère hydrophobe ou hydrophile. Les principales interactions s'effectuent à l'intérieur du repli de la protéase dont la structure assure la spécificité de reconnaissance. Schechter et Berger ont proposé en 1967, une nomenclature pour faciliter l'expression de la spécificité des protéases. Par convention, les acides aminés du substrat peptidique sont représentés par la lettre P (*P* pour peptide), et les sous-sites sur l'enzyme par la lettre S. On appelle sous-site, la partie de la protéase qui accueille une unique chaîne latérale d'un résidu d'acide aminé du substrat. Selon la nomenclature de Schechter et Berger, la liaison peptidique hydrolysée est la liaison P1-P1'. A partir de ce site de clivage, les résidus du substrat peptidique sont numérotés *P1*, *P2*, ..., *Pn* en direction de l'extrémité *N*-terminale et *P1'*, *P2'*, ..., *Pn'* vers l'extrémité *C*-terminale. Les sous-

sites qui accueillent ces résidus sont respectivement numérotés $S1$, $S2$, ..., S_n et $S1'$, $S2'$, ..., S_n' . (Figure I- 4).¹¹



Figure I- 4 : Représentation schématique des interactions protéase-substrat peptidique selon la nomenclature de Schechter et Berger (*illustration d'après E. Jaspard, 2013*)

I.2.2. Mode d'action proprement dit

Les protéases utilisent trois types de mécanismes catalytiques fondamentaux : la catalyse covalente, la catalyse acide-base et la catalyse par des ions métalliques.

➤ Catalyse covalente

Dans la catalyse covalente, un groupement réactif du site actif de l'enzyme, est engagé dans une liaison covalente transitoire avec le substrat. Ce groupement réactif est en général un groupe nucléophile hydroxyle ou thiol (Figure I- 5a et b). L'intermédiaire covalent acyl-enzyme est ensuite hydrolysé par une molécule d'eau pour compléter la catalyse et régénérer l'enzyme. Les protéases à sérine, à cystéine ou à thréonine utilisent ce type de mécanisme (*Cf.* mécanisme catalytique détaillé, section II.2.).

➤ Catalyse acide-base

Dans la catalyse acide-base, une molécule d'eau est directement activée pour jouer le rôle de nucléophile, et promouvoir l'attaque nucléophile de la liaison peptidique. Ce mode de catalyse est utilisé par les aspartyl-protéases (Figure I- 5c).

➤ Catalyse par des ions métalliques

Dans la catalyse métallique, une molécule d'eau, activée par le cation métallique, intervient comme nucléophile pour cliver la liaison peptidique. Les interactions ioniques entre l'enzyme, le métal lié à l'enzyme, et le substrat aident à orienter le substrat pour la catalyse ou les états de transition de la réaction. Ce mode de catalyse est utilisé par les métallo-protéases (Figure I- 5d).

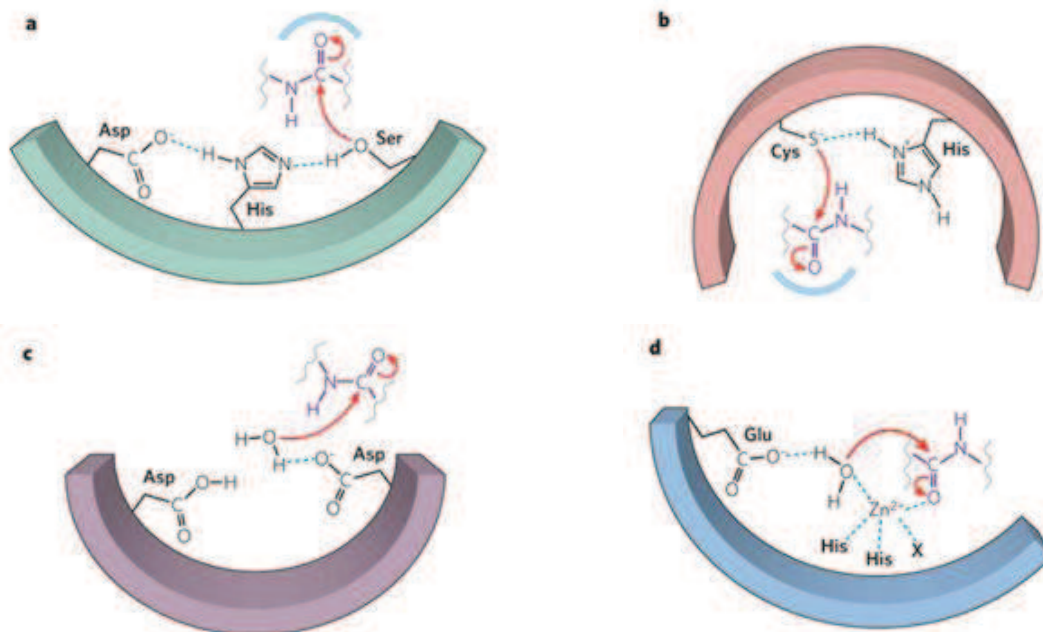


Figure I- 5 : Mécanisme d'action des protéases¹²
a et b : catalyse covalente ; c : catalyse acide-base ; d : catalyse métallique

L'activité des enzymes n'a d'intérêt que lorsqu'elle est régulée. Ainsi, en fonction des besoins de la cellule, l'organisme doit être en mesure de moduler l'activité enzymatique cellulaire.

I.3. Régulation de l'activité des protéases

Toutes les enzymes ne fonctionnent pas en même temps dans une cellule. L'activité enzymatique est régulée en fonction des besoins de la cellule. La modulation des enzymes peut s'exercer au niveau de l'expression des gènes, ce qui règle la quantité des enzymes disponibles. Elle peut se faire aussi en contrôlant l'activité du site catalytique selon plusieurs modalités.

I.3.1. Modulation de la quantité d'une enzyme

Le contrôle de la quantité des enzymes en conditions physiologiques se fait généralement par action sur leur synthèse et leur dégradation, ou encore par compartimentation.

I.3.1.1. Action sur la synthèse et la dégradation

La régulation de la quantité des enzymes par action directe sur la synthèse protéique s'exerce sur l'expression des gènes. En effet, en se liant sur des séquences d'ADN, les protéines régulatrices de gène peuvent activer ou inhiber la transcription d'un gène donné en ARN messager (ARNm). Certaines protéines régulent la maturation des ARNm (épissage, dégradation nucléaire,

etc.) ; d'autres régulent la quantité d'ARNm traduite en protéines enzymatiques. Certaines hormones (stéroïdiennes, thyroïdiennes) peuvent également agir sur le taux de synthèse des enzymes.

I.3.1.2. Compartimentation

La compartimentation consiste en une localisation restreinte de l'enzyme dans un tissu ou organelle. Chaque compartiment a des fonctions métaboliques spécialisées, et les enzymes contribuant à ces fonctions y sont confinées. Par exemple, la cytochrome oxydase, une enzyme de la chaîne respiratoire, est présente uniquement dans la mitochondrie. De même, l'activité des cathepsines est limitée dans les lysosomes.¹³ Par exemple, les cathepsines B, D et L catalysent dans les lysosomes, la libération d'hormones thyroïdiennes à partir de la thyroglobuline (Tg).¹⁴

I.3.2. Modulation de l'activité enzymatique

Les principes de régulation de l'action des enzymes reposent sur l'affinité de l'enzyme pour un substrat donné. La modulation de l'activité enzymatique peut se faire de plusieurs manières¹⁵ :

- clivage protéolytique : la régulation de l'activité dépend dans ce cas de l'action protéolytique préalable d'une autre enzyme.
- régulation allostérique : le régulateur se fixe sur un site autre que le site catalytique et entraîne un changement conformationnel de l'enzyme. La régulation allostérique peut s'effectuer grâce à des cofacteurs (ions métalliques, sucres).
- modification covalente : phosphorylation, déphosphorylation, etc.
- association à des inhibiteurs endogènes (exemple des serpins pour les sérine-protéases).

I.3.2.1. Régulation par clivage protéolytique

Les protéases sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs, appelés zymogènesⁱ. Ces précurseurs sont activés par un clivage protéolytique, grâce à d'autres protéases ou selon un mécanisme d'autolyse. Du fait de leur capacité à cliver les liaisons peptidiques de manière irréversible, l'activité des protéases est strictement contrôlée. Par exemple, la trypsine est biosynthétisée sous forme de trypsinogène. Le trypsinogène inactif est clivé entre les acides

ⁱ *Forme inactive d'une enzyme qui nécessite un clivage protéolytique pour son activation.*

aminés 6 et 7 (Lysine et Isoleucine) de sa séquence peptidique par une entéropeptidase pour donner la trypsine. L'activation du trypsinogène en trypsine peut se faire de manière auto-catalytique. La trypsine participe à l'activation d'autres protéases comme l' α -chymotrypsine, la carboxypeptidase, l'élastase (Figure I- 6).

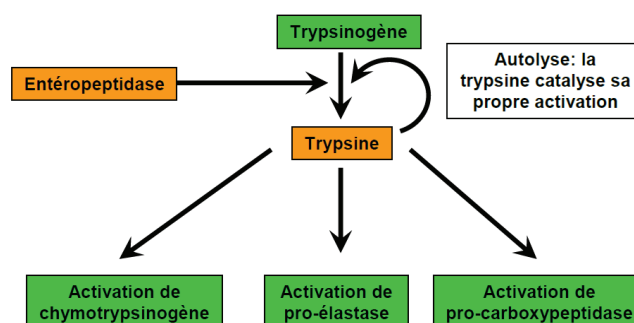


Figure I- 6 : Régulation de l'activité enzymatique par clivage protéolytique

La protéolyse n'est pas toujours nécessaire à l'activation des protéases. Par exemple, le Facteur VII subit une activation allostérique par des facteurs tissulaires dans la cascade de la coagulation sanguine.¹⁶

I.3.2.2. Régulation allostérique

L'allostérie est un mode de régulation dans lequel l'enzyme établit des liaisons non covalentes avec une molécule autre que son substrat, sur un site différent du site actif. Cet autre site spécifique sur lequel a lieu la modification non covalente est appelé site régulateur ou site allostérique. Dans ce type de régulation, les enzymes sont souvent soumises à un phénomène de rétrocontrôle. Le rétrocontrôle négatif ou « *feedback inhibition* » est un processus où le produit final d'une série de réactions, inhibe spécifiquement l'activité d'une enzyme qui catalyse l'une des réactions. Les régulateurs allostériques sont généralement des petites molécules ou des cofacteurs. Par exemple, l'héparine (glycosaminoglycane : GAG) et ses dérivés sont des inhibiteurs allostériques des protéases de la coagulation sanguine.¹¹

L'ajout de groupements chimiques sur la protéase constitue également un autre moyen de réguler l'activité protéolytique.

I.3.2.3. Régulation par modifications covalentes

En général, les modifications covalentes sur les protéines s'effectuent par ajout de groupements chimiques (phosphate, méthyle, acétyle, etc.) ou de protéines entières (ubiquitine) sous l'action d'enzymes spécifiques. Elles permettent d'activer ou de désactiver les protéines, modifiant ainsi leur fonction. Les modifications covalentes les plus courantes comprennent la méthylation, l'acétylation, l'adénylation, l'uridylylation, l'ADP-ribosylation, l'ubiquitination, la myristoylation, la phosphorylation. Les groupes chimiques ainsi ajoutés peuvent être éliminés par d'autres enzymes et permettent par conséquent à ces modifications d'être réversibles : déméthylation, désacétylation, déphosphorylation, désadénylylation.¹

La phosphorylation qui consiste en l'addition d'un groupe phosphate (PO_4^{3-}) est la modification post-traductionnelle la plus importante sur les protéines. Elle a lieu sur les résidus sérine, thréonine ou tyrosine par estérification sous l'action des protéines kinases (Schéma I- 2).

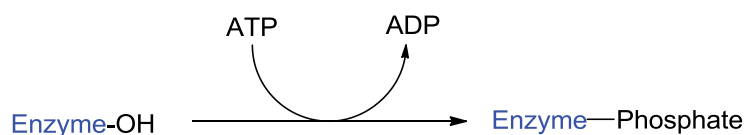


Schéma I- 2 : Représentation schématique d'une réaction de phosphorylation

La phosphorylation est une modification réversible car les groupes phosphates ajoutés peuvent être éliminés sous l'action des phosphatases (Figure I- 7).

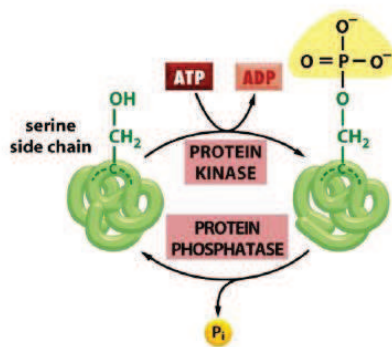


Figure I- 7 : Illustration de la phosphorylation/déphosphorylation d'une enzyme

Par exemple, l'activité protéolytique de la protéine HtrA2 est régulée par phosphorylation. La protéine HtrA2 encore appelée Omi, est une protéase à sérine de 49 kDa constituée de 458 acides aminés, qui se trouve dans la mitochondrie. Sa triade catalytique est composée des résidus His198, Asp228 et Ser306. La protéase HtrA2 possède un domaine de régulation amino-terminal

et un domaine catalytique carboxy-terminal. Son activité protéolytique est essentielle à l'homéostasie mitochondriale. Elle joue également un rôle dans l'apoptose. Les mutations qui inactivent cette enzyme sont associées à des désordres neurodégénératifs tels que la maladie de Parkinson.^{17, 18} Le domaine de régulation de cette protéase possède un site de phosphorylation pour la kinase p38 en position 142 (résidu Ser142). La protéine p38 est une kinase qui est activée par des stimuli tels que le stress, et joue un rôle dans l'activation de la réponse immunitaire. Chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, la phosphorylation par la kinase p38 peut augmenter l'activité protéolytique de HtrA2. Cette observation fait de HtrA2, une protéine de survie car elle peut ainsi empêcher les altérations protéiques, ou activer une voie protectrice de réponse au stress pour supprimer les protéines mal-structurées.^{19,20,21} Par ailleurs, la protéine HtrA2 peut être phosphorylée sur un autre site (résidu Ser212) par les sérine/thréonine kinases Akt1 et Akt2. La conséquence de cette phosphorylation est une diminution de son activité protéolytique et une altération de sa fonction dans l'apoptose.²² Au final, selon les sites de phosphorylation et les kinases qui interviennent, l'activité protéolytique d'une protéase peut être amplifiée ou atténuée.

Un autre mécanisme important de régulation de l'activité des protéases est gouverné par leur association à des inhibiteurs endogènes.

I.3.2.4. Régulation par association à des inhibiteurs endogènes

L'activité de nombreuses protéases est régulée par des inhibiteurs endogènes. Cette régulation est généralement basée sur la formation d'un complexe entre l'inhibiteur et l'enzyme. Dans la majorité des cas, l'inhibition est réversible (association de l'inhibiteur à des ions par exemple).^{23,24} Il existe également des inhibiteurs qui, en s'associant à l'enzyme, l'inhibent de façon irréversible : c'est le cas des serpins.²⁵ Le mécanisme d'inhibition de certains inhibiteurs de protéases sera abordé en détail dans le chapitre consacré aux kallicréines (*Cf.* section III.2.4.1.).

Que se passerait-il si le processus de régulation des enzymes était perturbé ? Une des réponses, sans doute, est le risque de survenue de pathologies. En effet, une protéolyse excessive ou inappropriée joue un rôle dans diverses atteintes physiopathologiques, telles que les maladies cardiovasculaires, inflammatoires, infectieuses, neurodégénératives, autoimmunes ou le cancer.¹¹ Il apparaît donc évident, qu'une prise en charge correcte de ces pathologies nécessite la compréhension des différents systèmes protéolytiques qui y sont impliqués.²⁶ Compte tenu de leur

rôle dans la plupart des pathologies, les protéases bénéficient d'une attention particulière. Ainsi, plusieurs équipes de recherches travaillent pour trouver de nouveaux outils diagnostiques et/ou thérapeutiques pour les maladies impliquant la dérégulation de protéases.⁵

I.4. Intérêt des protéases

Par le clivage des protéines, les protéases assurent la coordination d'une grande variété de fonctions physiologiques qui vont du recyclage des protéines intracellulaires à la digestion des nutriments, en passant par l'amplification des cascades au sein du système immunitaire.

Les enzymes protéolytiques peuvent agir comme des effecteurs positifs ou négatifs de nombreux processus biologiques, comme des catalyseurs non spécifiques de la dégradation des protéines ou encore comme des agents très sélectifs contrôlant divers événements physiologiques.²⁷ Par exemple, la thrombine (EC 3.4.21.5) est une protéase à sérine qui participe à l'hémostase en catalysant la transformation du fibrinogène en fibrine et en activant les plaquettes. La pepsine (EC 3.4.23.1) est une peptidase du suc gastrique qui hydrolyse les protéines du bol alimentaire. Le rôle de certaines protéases est associé à la suppression de produits endommagés ou indésirables de l'organisme. Par exemple, les protéases de la famille des caspases interviennent dans une cascade d'activités protéolytiques conduisant à l'apoptose.²⁸ Les cathepsines à cystéine et à acide aspartique régulent la dégradation des protéines endocytées.²⁹

Bien plus que des enzymes de dégradation, les protéases sont considérées comme d'importantes molécules de signalisation. La cascade de la coagulation sanguine est le prototype de cascade protéolytique qui implique l'activation séquentielle des zymogènes de protéases à sérine. L'étape finale de cette cascade est l'activation de la thrombine, laquelle convertit le fibrinogène en fibrine, conduisant ainsi à la formation du caillot sanguin.¹¹ Outre l'amplification du signal, cette cascade fournit de nombreux points de régulation susceptibles d'assurer une bonne coordination de l'hémostase.⁵ Les protéases sont ainsi décrites pour leurs propriétés protectrices, c'est-à-dire leur aptitude à empêcher le développement de nombreuses maladies.

Cette notion de protection peut être également illustrée par le rôle fondamental que jouent les caspases (protéases à cystéine) dans l'apoptose dont la dérégulation est l'une des caractéristiques du cancer. Plusieurs études ont démontré par exemple, que la perte de l'activité du gène caspase 8 (*CASP8*) était à l'origine de nombreuses tumeurs incluant notamment les carcinomes gastriques, pulmonaires, colorectaux, cervicaux ainsi que les neuroblastomes. Ces protéases à cystéine intracellulaires agiraient donc en tant que suppresseurs de tumeurs.²⁶ Outre

leurs rôles de régulateurs de multiples processus biologiques, il est établi aujourd'hui que les protéases sont associées à une large variété de conditions pathologiques incluant les dermatoses et les cancers. En 1946, Fisher a proposé un lien entre la dégradation des composants de la matrice extracellulaire, la facilitation de l'invasion tumorale et les métastases.³⁰ Dans les années 1970, on a commencé à identifier les protéases ayant des activités pro-métastatiques telles que certains membres de la famille des métallo-protéases ainsi que des membres de la famille des protéases à sérine et à cystéine.²⁶ Depuis, de nombreuses études ont été effectuées sur leurs implications physiopathologiques. Certaines protéases extracellulaires telles que les métallo-protéases matricielles (MMP) et les activateurs du plasminogène semblent favoriser la cancérogénèse car elles sont surexprimées dans certains cancers.²⁹ Ce constat a conduit au développement d'inhibiteurs de protéases extracellulaires pour lutter contre la progression tumorale et les métastases, notamment les inhibiteurs de métallo-protéases de matrice. Paradoxalement, les essais cliniques ont montré que l'utilisation de ces inhibiteurs chez certains patients, était à l'origine d'une accélération de la progression tumorale. En effet, les inhibiteurs étaient non spécifiques des métallo-protéases matricielles pour la plupart.²⁶ Il faut noter cependant que toutes les métallo-protéases ne sont pas tumorigènes. Par exemple, l'enzyme neutrophile MMP8 possède des propriétés antitumorales.³¹ On admet actuellement que les protéases interviennent à tous les stades de la progression tumorale. Elles peuvent donc agir comme des molécules de signalisation dans les processus cancéreux incluant la prolifération, la migration, la différenciation, l'angiogénèse, l'apoptose, etc.^{32,33,29} Finalement, le principal défi dans la lutte anticancéreuse est sans doute, la conception de molécules capables de discriminer les protéases pro-cancérigènes et celles ayant des propriétés anti-cancérigènes en s'appuyant sur une connaissance précise de leur dégradomeⁱⁱ. Le présent travail s'inscrit dans cette optique pour développer des inhibiteurs hautement spécifiques des kallikréines, un groupe d'enzymes appartenant à la famille des protéases à sérine (Figure I- 8).

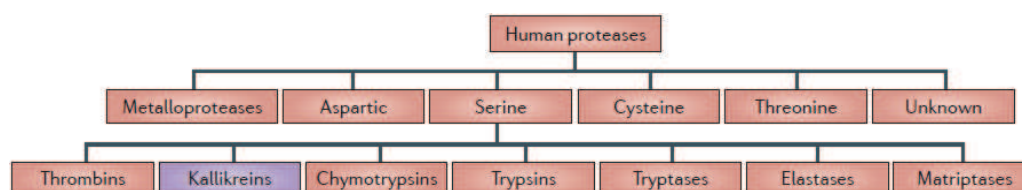


Figure I- 8 : Famille des protéases humaines et sous-familles des protéases à sérine³⁴

ⁱⁱ Répertoire des acteurs naturels intervenant dans la protéolyse (protéases, substrats, activateurs, inhibiteurs)

II. LES PROTÉASES A SÉRINE

Les protéases à sérine représentent le groupe le plus important des protéases. Elles sont impliquées dans la coordination des processus biologiques tels que la digestion, la réponse immunitaire, la coagulation sanguine, la reproduction, la maturation des virus. Ce sont des endopeptidases dont l'activité fait intervenir le groupement hydroxyle de la chaîne latérale d'un résidu sérine du site actif, d'où l'appellation « protéases à sérine. » Deux autres résidus caractéristiques participent à leur action : un résidu histidine, et un résidu acide aspartique. Ces trois résidus forment la triade catalytique.

Les protéases à sérine sont reconnaissables à leurs séquences d'acides aminés. Ces acides aminés sont numérotés successivement du premier au dernier dans la séquence protéique. Les acides aminés de la triade catalytique sont positionnés à des endroits bien précis le long de cette séquence. Dans le cas des protéases à sérine appartenant au clan PA (*Cf.* classification de MEROPS, section I.1.3.), comme c'est le cas pour la kallicréine 7, c'est la chymotrypsine, chef de file du clan qui sert conventionnellement de base pour la numérotation des acides aminés. Ainsi l'histidine du site catalytique est le 57^{ème} acide aminé, l'acide aspartique le 102^{ème}, et la sérine réactive se trouve à la 195^{ème} position dans l'enchaînement des acides aminés de la séquence (Figure I- 9).

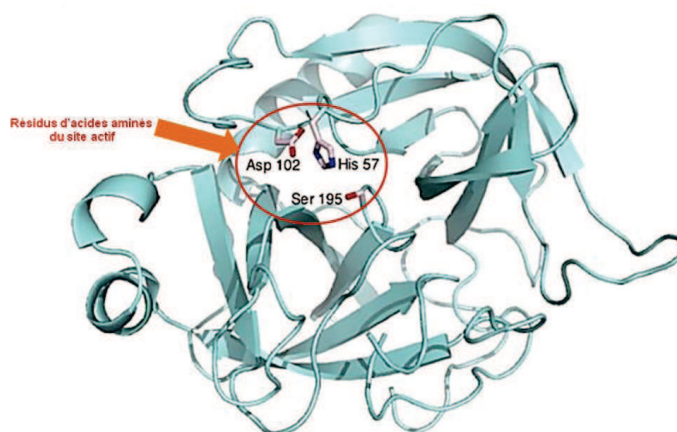


Figure I- 9 : Triade catalytique du site actif de la chymotrypsine, protéase à sérine typique

Il existe également des protéases à sérine dites « non classiques » pour lesquelles des variations sont observées. Ces différences sont relatives soit à la place des résidus catalytiques dans la chaîne peptidique (His198, Asp228 et Ser306 pour la protéase à sérine HtrA2 par exemple), soit à la nature et au nombre de résidus impliqués dans la catalyse (Ser/His/Glu, Ser/His/His, Ser/Glu/Asp, Ser/Lys, Ser/His).^{17, 35}

Du fait de leurs implications dans divers phénomènes biologiques et pathologiques, les protéases à sérine constituent des cibles prometteuses dans le traitement de beaucoup de maladies. Après une brève présentation des différentes classes de protéases à sérine, nous décrirons leur mécanisme général d'action, en prenant pour modèle celui de la chymotrypsine. Ensuite, nous rappellerons les principaux acteurs impliqués dans le contrôle de leur action protéolytique, avant de faire une description des kallicréines.

II.1. Classification des protéases à sérine

Trois classes de protéases à sérine peuvent être définies selon leurs spécificités envers les substrats : les analogues de trypsine, de chymotrypsine ou d'élastase. Les enzymes de chacune des trois classes effectuent le clivage du lien peptidique à la suite d'un acide aminé précis, ce qui leur confère une certaine spécificité (Figure I- 10). Les caractéristiques de ces différentes classes sont résumées dans le Tableau I- 3.³⁶

Désignation	Poche S1 (Enzyme)	Résidu P1 (Substrat)
Analogues de trypsine	Etroite, profonde et chargée négativement	Chargé positivement (Lys ou Arg)
Analogues de chymotrypsine	Large et hydrophobe	Hydrophobe de taille moyenne ou grande (Tyr, Phe, Leu)
Analogues d'élastase	Réduite et hydrophobe	Hydrophobe de petite taille (Ala)

Tableau I- 3 : Les différentes classes de protéases à sérine et leurs caractéristiques

➤ Spécificité enzymatique des protéases à sérine

La spécificité enzymatique des protéases dépend de la nature des résidus du substrat peptidique qui interagissent avec les sous-sites de l'enzyme. En effet, les différences de forme des poches des protéases à sérine leur permettent de positionner certains substrats et d'en exclure d'autres. Par exemple, la trypsine préfère accueillir au sein de sa poche S1, les acides aminés chargés positivement (Arginine et Lysine) parce qu'un acide aminé négativement chargé (acide aspartique) est situé au fond de la poche. De même, l'élastase préfère les acides aminés à courte chaîne latérale en S1, parce que la présence d'une valine et d'une thréonine bloque l'entrée de sa poche (Figure I- 10).

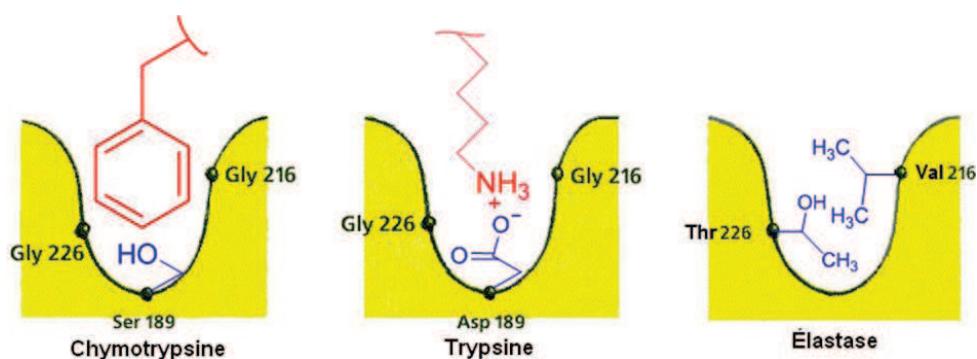


Figure I- 10 : Spécificité des poches des protéases à sérine

II.2. Mécanisme d'action catalytique

Les protéases à sérine possèdent une très grande spécificité de substrat, et leur activité est maximale à pH légèrement alcalin (pH entre 8 et 9).

La première protéase à sérine explorée en détail par les scientifiques est la chymotrypsine, une enzyme digestive, synthétisée dans le pancréas.³⁷ Des études cristallographiques de la structure tridimensionnelle de cette enzyme ont permis de mettre en évidence son mécanisme d'action catalytique. En effet, D. M. Blow et *al.* ont rapporté en 1969, un arrangement spatial de trois acides aminés à l'origine d'un mouvement de protons et de charges dans le site actif de la chymotrypsine : l'acide aspartique 102, l'histidine 57, et la sérine 195. Cet arrangement spatial spécifique a été retrouvé chez plusieurs autres protéases à sérine. Dès lors, ces trois acides aminés constituent la « triade catalytique » de référence des protéases à sérine.³⁸

En règle générale, la capacité d'une enzyme à catalyser une réaction dépend de son aptitude à former préalablement un complexe avec le substrat appelé complexe de Michaelis (*Cf.* section I.1.). De l'attaque nucléophile de la sérine 195 à la restitution de l'enzyme active, le cycle catalytique peut être divisé en deux grandes phases de deux étapes chacune (Schéma I- 3).

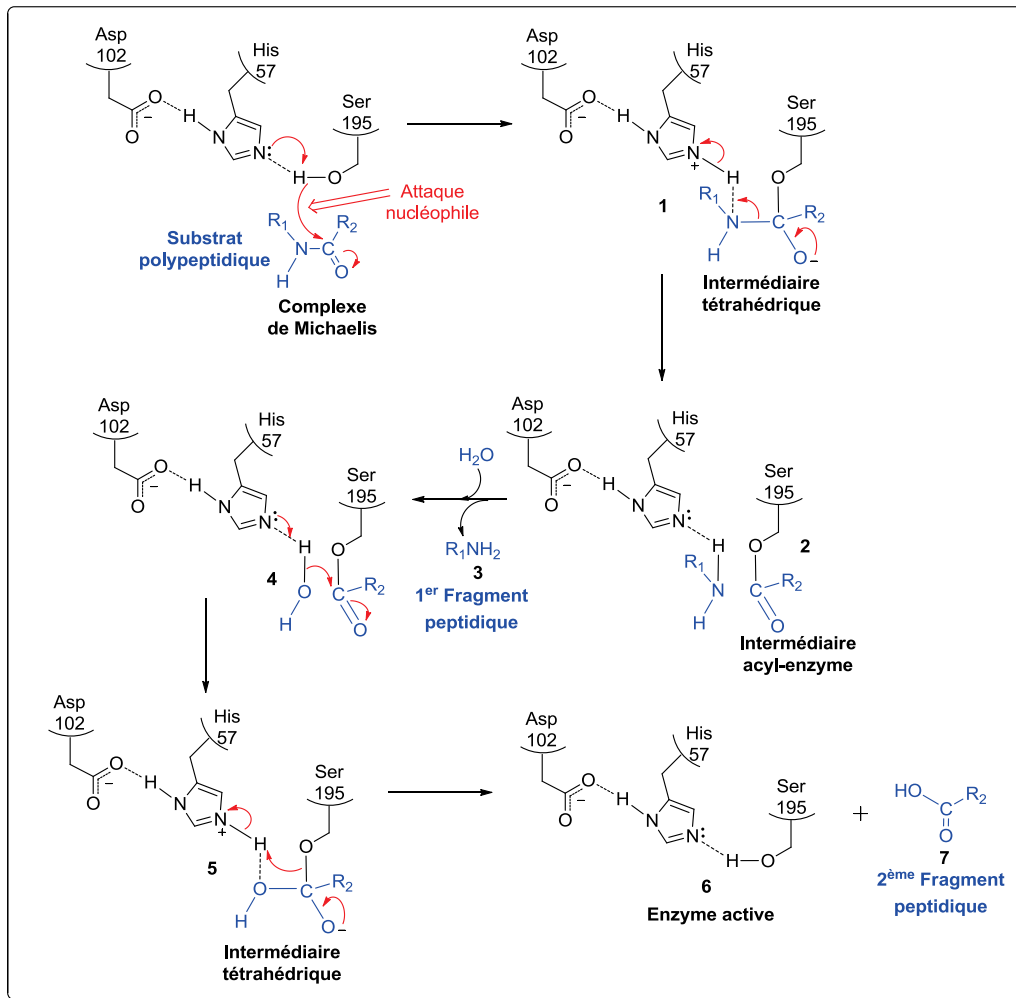


Schéma I- 3 : Mécanisme d'action catalytique des protéases à sérine

➤ Phase I : Acylation avec coupure de la liaison peptidique

C'est la phase où il y a formation du complexe de Michaelis. L'histidine 57 et l'aspartate 102 se positionnent, afin que la liaison O-H de la sérine soit fortement polarisée, pour amorcer la réaction enzymatique.

Étape 1 : L'interaction entre la sérine 195 et l'histidine 57 transforme le groupement hydroxyle de la sérine en ion alkoxide fortement nucléophile qui peut attaquer le groupe carbonyle de la liaison peptidique à hydrolyser. Il en résulte une distorsion conformationnelle avec formation d'un intermédiaire tétraédrique. Cela favorise le déplacement de l'oxygène du carbonyle qui développe une charge partielle négative (oxyanion), dans une région plus profonde du site actif appelé « trou de l'oxyanion. » Le trou de l'oxyanion va permettre de stabiliser

l'oxygène du carbonyle par la formation de liaisons hydrogène avec les amines des résidus Gly193 et Ser195 (Figure I- 11).

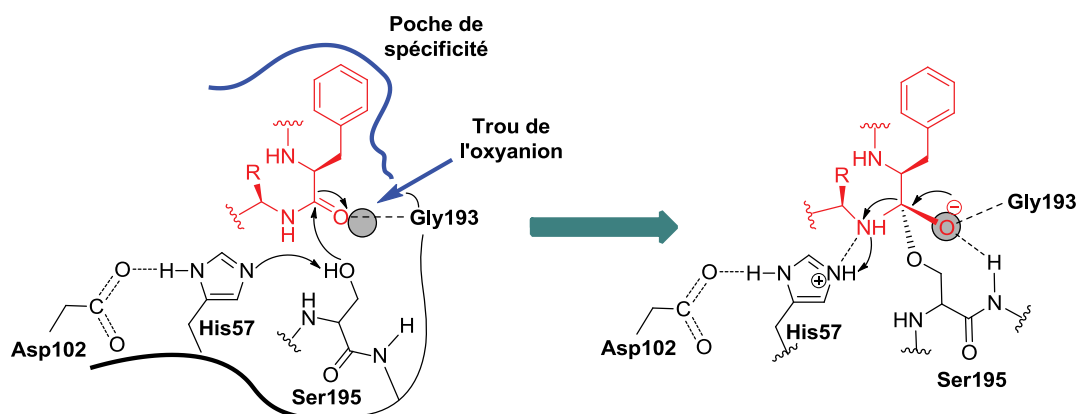


Figure I- 11 : Stabilisation de l'oxygène du carbonyle dans le trou de l'oxyanion

Étape 2 : L'intermédiaire tétraédrique instable, se réarrange pour libérer l'acyl-enzyme (composé **2**, Schéma I- 3), après coupure du lien peptidique. Le groupe amine naissant est protoné par l'histidine 57, facilitant ainsi le départ d'un premier fragment peptidique (composé **3**) issu de ce clivage.

➤ **Phase II : Déacylation avec restitution de l'enzyme active**

Cette phase répète essentiellement la séquence décrite ci-dessus, et permet de régénérer l'enzyme. Une molécule d'eau se positionne à la place du fragment peptidique libéré, pour jouer le rôle de nucléophile.

Étape 3 : La molécule d'eau est déprotonée par l'histidine 57. L'ion hydroxyde qui en résulte effectue une attaque nucléophile sur le carbonyle du lien ester de l'intermédiaire acyl-enzyme, conduisant ainsi à la formation d'un second intermédiaire tétraédrique (composé **5**).

Étape 4 : L'enzyme active **6** est régénérée à partir de l'intermédiaire tétraédrique **5**, avec libération du deuxième fragment peptidique (composé **7**).

II.3. Contrôle de l'activité des protéases à sérine

Par définition, la fonction des protéases est de cliver les protéines et les peptides. En dépit de leurs fonctions qui assurent la vie, ces enzymes peuvent être potentiellement dangereuses dans les systèmes vivants. Par conséquent, leur activité doit être strictement contrôlée.^{39, 40} Comme nous l'avons rappelé précédemment (*Cf.* section I.3.), le contrôle de l'action des protéases commence au niveau de l'expression du gène. Ce contrôle passe par la transcription et la traduction et se poursuit par le ciblage de l'activation des zymogènes. Une fois activées, les protéases doivent être régulées par des inhibiteurs naturels endogènes ou exogènes afin d'empêcher les dégradations protéolytiques non désirées.³³ Les principaux inhibiteurs endogènes qui participent à la régulation des protéases à sérine sont des ions métalliques, des macroglobulines et des serpins (*serine protease inhibitors*) par exemple. Nous y reviendrons dans la section III.2.4.1.

Par ailleurs, de nombreux travaux portent sur la synthèse d'inhibiteurs exogènes de diverses protéases à sérine. Certains composés ont déjà fait l'objet d'une commercialisation. Par exemple, le siméprévir (OLYSIO®) a obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en mai 2014.⁴¹ Il s'agit d'un peptidomimétique inhibiteur réversible et sélectif de la protéase à sérine NS3/4A du virus de l'hépatite C (VHC).⁴² Le rivaroxaban (XARELTO®) et l'apixaban (ELIQUIS®) sont commercialisés en France pour la prévention des événements thromboemboliques veineux. Ces deux composés agissent par inhibition directe du facteur Xa de la coagulation, sérine protéase capable d'activer la prothrombine en thrombine. Ces composés empêchent ainsi la formation du thrombus. D'autres inhibiteurs de la coagulation, le dabigatran (PRADAXA®) et ses composés apparentés sont également des exemples d'inhibiteurs de sérine protéases commercialisés aujourd'hui. Ces derniers agissent comme inhibiteurs compétitifs et réversibles de la thrombine, sérine protéase *trypsine-like*, empêchant la formation du caillot de fibrine, étape finale de la coagulation sanguine.

Dans la grande famille des protéases à sérine, les kallicréines représentent un groupe dont le rôle est décrit dans de nombreux processus physiologiques, tels que la coagulation, l'inflammation, la croissance cellulaire, le remodelage tissulaire, etc. Des études récentes montrent une association entre une dérégulation de l'expression de certaines kallicréines et la survenue de

pathologies complexes comme le cancer.^{33,43} Les kallicréines pourraient ainsi constituer des cibles thérapeutiques d'intérêt.

III. LES KALLICRÉINES

Les kallicréines sont des protéases à sérine initialement décrites pour leur capacité à générer des kinines à partir des kininogènes. Les abréviations KLK et hK sont conventionnellement utilisées pour désigner les kallicréines. Dans ce document, l'utilisation de l'abréviation KLK sera privilégiée.

La première kallicréine a été décrite pour son rôle protéolytique dans un système peptidergique dont la découverte remonte au début du XX^{ème} siècle. En 1909, deux physiologistes français, Abelous et Bardier, démontrent les propriétés hypotensives chez le chien et le lapin, de l'injection intraveineuse de protéines extraites de l'urine humaine.⁴⁴ Par la suite, dans les années 1930, E. Werle et *al.* ont découvert dans le pancréas humain une substance capable de produire une kinine. Ils ont alors introduit le terme kallicréine pour désigner cette substance (du grec "Kallikreas" qui signifie pancréas).⁴⁵ Ce système peptidergique complexe, à action vasodilatatrice est appelé système kallicréine-kininogène-kinines (KKK) dont les acteurs sont les kallicréines, les kininogènes et les kinines.

Les kinines sont des peptides vasoactifs générés à partir des kininogènes sous l'action des kallicréines (également appelées kininogénases). Chez l'homme, on a décrit deux types de kininogènes comme substrat des kallicréines, suivant leur poids moléculaire : le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM, 110 kDa) et celui de bas poids moléculaire (KBPM, 66 kDa). Il existe deux grands groupes de kallicréines qui diffèrent par leurs propriétés physico-chimiques et fonctionnelles, leurs substrats et leurs localisations : la kallicréine plasmatique et les kallicréines tissulaires qui participent respectivement à la formation plasmatique et tissulaire des kinines.

III.1. Système kallicréine-kininogène-kinines

Dans le sang, le facteur de déclenchement de la formation des kinines est l'activation du facteur de Hageman (Facteur XII), suite à l'endommagement d'un endothélium vasculaire. L'activation subséquente de la kallicréine plasmatique, à partir de la pré-kallicréine, permet la formation de la bradykinine (BK), à partir du kininogène de haut poids moléculaire (KHPM).⁴⁶ La kallicréine plasmatique est une protéase à sérine de 60 kDa qui est codée par un seul gène de 15

exons localisé sur le chromosome 4q35. Cette protéase est synthétisée au niveau du foie sous forme d'un précurseur inactif, la prékallicréine ou kallicréinogène. Elle circule dans les vaisseaux sanguins sous cette forme, complexée au kininogène de haut poids moléculaire. Elle intervient dans diverses fonctions physiologiques dont la coagulation sanguine, la fibrinolyse et l'inflammation.⁴⁷ Son activité est contrôlée par plusieurs inhibiteurs protéiques endogènes tels que l'inhibiteur de la protéine C1, l'antithrombine III et l' α 2-macroglobuline.

Dans les tissus, le précurseur des kinines est le kininogène de bas poids moléculaire (KBPM). Alors qu'un gène unique code pour la kallicréine plasmatique, les kallicréines tissulaires (PM : 24 à 48 kDa) sont codées par plusieurs gènes. Elles permettent la formation de la kallidine (KD), à partir du kininogène de bas poids moléculaire (KBPM). La kallidine est également appelée *lysyl*-bradykinine (LysBK), du fait qu'elle possède une lysine supplémentaire par rapport à la bradykinine. Il est à noter que les kallicréines tissulaires sont également capables de dégrader le kininogène de haut poids moléculaire.⁴⁸ Leur activité est spécifiquement contrôlée par un inhibiteur endogène, la kallistatine.

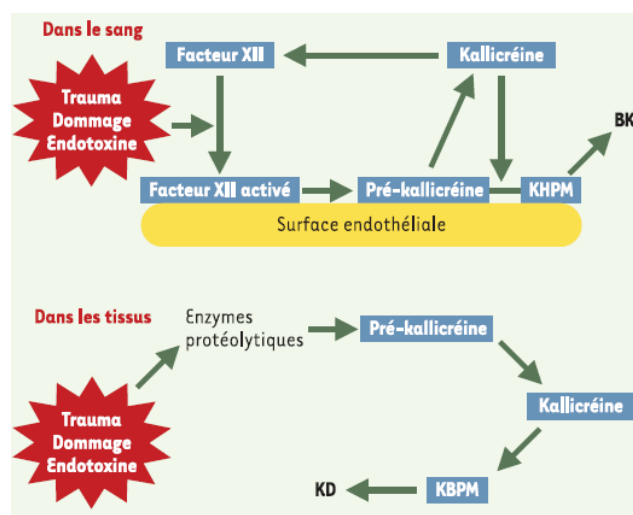


Figure I- 12 : Principales voies biochimiques impliquées dans la formation plasmatique et tissulaire des kinines.⁴⁶

D'une manière générale, les kinines (bradykinine et kallidine) sont des médiateurs importants impliqués dans les phénomènes d'homéostasie cardiovasculaire, d'inflammation et de nociception.^{49, 50} La bradykinine est un nonapeptide, tandis que la kallidine est un décapeptide.

- **bradykinine** : H-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH
- **kallidine** : H-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH

Les kinines jouent un rôle fondamental dans le développement normal et harmonieux du système cardiovasculaire, dans l'hypertension artérielle, dans l'angiogénèse,⁵¹ et le diabète. Il a été montré par exemple, lors d'expériences d'ischémie/reperfusion chez le lapin, que la perfusion préalable de bradykinine réduit l'ampleur de l'infarctus du myocarde.⁵² Cela pourrait s'expliquer par sa capacité à s'opposer à la vasoconstriction induite par le système sympathique au cours de l'ischémie myocardique.

Traditionnellement (jusqu'au début du XXI^{ème} siècle), la famille des kallicréines tissulaires était connue pour le rôle de la KLK1 dans le système kallicréine-kininogène-kinines et pour l'importance de la KLK3 comme biomarqueur dans le dépistage du cancer de la prostate.^{49, 44, 50, 53} Grâce aux travaux réalisés au cours de la dernière décennie, on connaît aujourd'hui l'existence d'autres kallicréines tissulaires auxquelles de nouvelles fonctions sont attribuées. Elles seraient notamment impliquées dans la régulation de la fonction rénale, la desquamation de la peau, la formation de l'émail dentaire, la plasticité neuronale synaptique.^{54,33,55,56,57} La Figure I- 13 indique la place des kallicréines connues à ce jour dans la classe des protéases à serine.

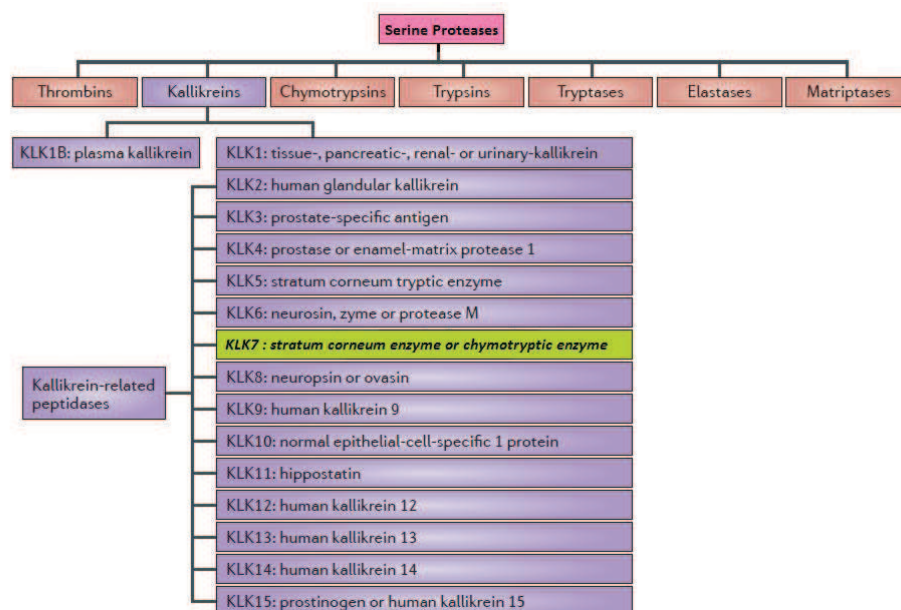


Figure I- 13 : Les kallicréines dans la classe des protéases à sérine³⁴

Dans le cadre de ce travail, nous ne détaillerons que les éléments relatifs aux kallicréines tissulaires. Nous ferons d'abord un rappel de la répartition tissulaire de ces protéases avant de discuter de leurs propriétés biologiques et de leurs implications dans des pathologies. Ensuite, après avoir présenté leur mode d'action catalytique, nous ferons un état de l'art des mécanismes mis en place pour leur régulation.

III.2. Les kallikréines tissulaires

Les kallikréines (KLK) tissulaires forment un sous-groupe de protéases à sérine. Selon le système MEROPS, elles appartiennent à la famille S1A du clan PA(S)⁵⁸ (Cf. section I.1.3.) et sont présentes dans au moins six ordres de mammifères. Chez l'homme, les KLK tissulaires sont codées par 15 gènes structurellement homologues. Ces gènes, situés en tandem dans la région 13.4 du chromosome 19 (chromosome 19q13.4), représentent le plus grand cluster de gènes contigus de protéases dans le génome humain. Ils sont situés entre les gènes *ACPT* (*testicular acid phosphatase gene*) et *SIGLEC9* (*sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 9 gene*) (Figure I-14).

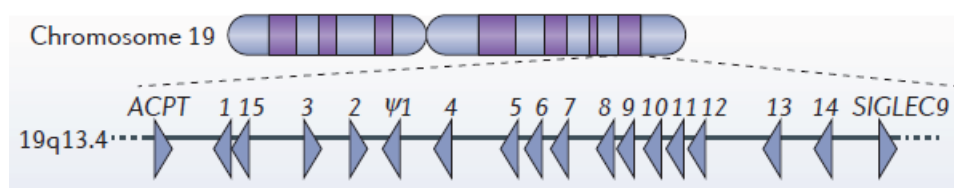


Figure I- 14 : Aperçu de la structure génomique des kallikréines tissulaires humaines³⁴
(Chaque flèche représente un gène KLK, et indique le sens de sa transcription)

Les KLK tissulaires possèdent cinq exons codants et des motifs d'introns.⁴⁵ Elles sont formées d'une seule chaîne polypeptidique et sécrétées sous forme de préproenzymes. La chaîne monomérique est constituée d'un peptide signal de 16 à 33 acides aminés, d'un pro-peptide de 4 à 9 acides aminés, d'une enzyme active de 227 à 252 acides aminés comportant une triade catalytique conservée. La triade catalytique est constituée des trois résidus d'acides aminés clés des sérine protéases classiques : Histidine (H57), Acide aspartique (D102) et Sérine (S195).^{33,34} L'activation des KLK requiert un clivage extracellulaire des pro-peptides ; la KLK mature correspond à un domaine catalytique unique. Les caractéristiques protéiques des KLK tissulaires humaines sont représentées dans la Figure I- 15. Les régions non traduites 5'UTR (5' *UnTranslated Region*) et 3'UTR sont montrées dans l'ARNm primaire schématique.

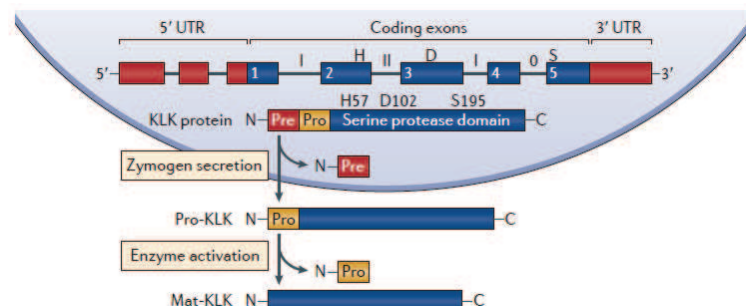


Figure I- 15 : Structure protéomique des kallikréines tissulaires humaines³⁴
Cases : exons ; Lignes : introns ; Lettres H, D et S : résidus catalytiques (histidine, acide aspartique et sérine).

III.2.1. Répartition tissulaire

Les kallikréines tissulaires sont exprimées dans plusieurs tissus incluant les glandes sudoripares et salivaires, le système nerveux central, le pancréas, le sein, la prostate, le rein. Chaque kallikréine est plus ou moins fortement exprimée selon les tissus. Certaines kallikréines sont exprimées dans un nombre restreint de tissus (KLK5 à KLK8 et KLK13) et d'autres sont exprimées de façon ubiquitaire (KLK1, KLK9 à KLK11, KLK14). Les kallikréines sont souvent co-exprimées dans un même tissu. L'exemple le plus remarquable est l'expression simultanée et presque exclusive de KLK2, KLK3, KLK4, KLK15 dans la prostate.^{59, 60} Des études *in situ* et/ou immuno-histochimiques, ont montré que l'expression des protéines KLK5 et KLK7 semble être limitée dans la couche granuleuse de l'épiderme normal (Tableau I- 4).^{61, 58}

	KLK1	KLK2	KLK3	KLK4	KLK5	KLK6	KLK7	KLK8	KLK9	KLK10	KLK11	KLK12	KLK13	KLK14	KLK15
BREAST															
CNS															
COLON															
HEART															
KIDNEY															
LUNG															
OVARY															
PANCREAS															
PROSTATE															
SALIVARY GLAND															
SKIN															
TESTIS															
THYMUS															
THYROID															
TRACHEA															
UTERUS															

Tableau I- 4 : Répartition tissulaire des kallikréines humaines^{59,60}
(noir : forte expression ; gris : expression détectée ; blanc : expression non détectée)

III.2.2. Propriétés biologiques et intérêts en thérapeutique

Les KLK tissulaires interviennent dans les mécanismes de régulation de nombreux processus biologiques, allant de la croissance cellulaire au remodelage tissulaire. L'intérêt de ces enzymes comme marqueurs tumoraux et leur implication dans les processus tumoraux a fait l'objet de nombreux travaux ces dernières années.^{62,55} Nous décrivons ici les progrès réalisés dans la détermination de leurs rôles biologiques ainsi que leurs implications thérapeutiques.

III.2.2.1. Rôles des « kallikréines classiques »

Les trois premières kallikréines découvertes (KLK1, KLK2 et KLK3), également appelées « *kallikréines classiques* » ont été largement étudiées, et plusieurs rôles biologiques leur ont été

attribués. Les travaux sur la KLK1 ont mis en évidence son implication dans la circulation sanguine, la perméabilité vasculaire et l'équilibre hydro-électrolytique.⁶³ L'activité principale de la KLK1 implique le clivage du kininogène de bas poids moléculaire pour libérer la kallidine (ou lysyl-bradykinine). Contrairement à la KLK1, les protéines KLK2 et KLK3 ont une activité kininogénase relativement faible. La KLK3, appelée aussi PSA (*Prostate-Specific Antigen*), est sécrétée par les cellules épithéliales de la prostate. Elle joue un rôle dans la liquéfaction du sperme et la libération des spermatozoïdes par clivage des séminogélines I et II. La fibronectine, les IGF-BPs (*Insulin-like Growth Factor Binding Protein*) et le plasminogène sont d'autres substrats de la KLK3. Cette kallikréine constitue un marqueur diagnostique utilisé en routine pour le dépistage du cancer de la prostate. Par ailleurs, les rôles physiologiques des autres kallikréines (KLK4 à KLK15) restent encore peu définis.

III.2.2.2. Rôles dans l'amélogénèse

La KLK4 interviendrait dans l'amélogénèse, c'est-à-dire la formation de l'émail dentaire. La KLK4 est sécrétée pendant les étapes de transition et de maturation des améloblastes lors de la formation de l'émail dentaire qui est une structure très minéralisée. Elle est activée par la métalloprotéase de matrice 20 (MMP20). Le rôle de la KLK4 est de dégrader les protéines de matrice de l'émail (amélogénine, énaméline, améloblastine) et de faciliter l'expansion latérale de l'hydroxyapatite cristallin de la dent.⁶⁴ Une diminution ou une absence de l'activité de la KLK4 est associée à une minéralisation défectueuse de la dent, entraînant des pathologies liées à une amélogénèse imparfaite.⁶⁵

III.2.2.3. Rôles dans la physiologie de la peau

L'activité des serine-protéases dans la physiologie normale de la peau est principalement attribuée aux KLK5, KLK7, KLK8 et KLK14. Les kallikréines 5 et 7 interviennent dans l'homéostasie épidermique.^{66, 67} Ce point sera abordé dans le chapitre consacré à la kallikréine 7.

III.2.2.4. Rôles dans le système nerveux

La KLK8, également appelée neuropsine, semble impliquée dans la plasticité synaptique.^{68, 69} Elle pourrait intervenir dans le développement neuronal⁷⁰ et dans les mécanismes de réponse au stress.⁷¹ La KLK8 a été récemment associée à la schizophrénie du fait de son action directe sur la neuréguline 1 (NRG1), une molécule régulatrice des neurones de l'hippocampe et du cortex

frontal pyramidal. L'expression anormale de la NRG1 est associée à un risque accru de développement de la schizophrénie.⁷²

La KLK6, autrefois appelée zyme, protéase M ou neurosine⁷³, pourrait avoir un rôle dans la physiologie normale du système nerveux central.^{74, 71} Bien que sa fonction physiologique ne soit pas tout à fait élucidée, la KLK6 a été décrite comme une protéase intervenant dans la régulation de la myéline.⁷⁵ Plusieurs protéines ont été rapportées comme des substrats potentiels *in vitro* de la KLK6, telles que la protéine de base de myéline humaine (MBP), le peptide β -amyloïde, le plasminogène, l' α -synucléine, etc.⁷⁶ Par exemple, par la dégradation de la protéine α -synucléine, la KLK6 empêche sa polymérisation et prévient ainsi la formation d'inclusions neuronales dans la maladie de Parkinson.⁷⁷ En effet, l'une des caractéristiques principales du syndrome de Parkinson est l'agrégation d' α -synucléine insoluble et la formation des corps de Lewy dans le cerveau des patients.⁷⁸ Ainsi, une dérégulation de la KLK6 semble être impliquée dans la maladie de Parkinson, mais également dans d'autres maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou la sclérose en plaques.^{79, 80} De plus, du fait de sa capacité à cliver les peptides de la matrice extracellulaire dérivés de la laminine et de la fibronectine, la KLK6 pourrait jouer un rôle dans la régénération tissulaire.^{81,82}

III.2.2.5. Implications des KLK dans le cancer

De nombreuses études rapportent l'implication des KLK tissulaires dans le cancer. La carcinogénèse est un phénomène complexe qui implique des altérations au niveau de l'ADN, de l'ARNm et des protéines. Le principal défi en cancérologie est d'identifier ces altérations et de déterminer leurs effets sur le phénotype tumoral. Des études ont montré que les 15 isoformes de la famille des KLK humaines sont différemment exprimées dans les cancers. Par exemple, les kallicréines 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14 et 15 sont surexprimées dans les tissus du carcinome ovarien. Plusieurs études indiquent l'implication des kallicréines tissulaires dans d'autres types de cancers. La KLK3/PSA est impliquée dans le cancer de la prostate. Les KLK 5, 6, 8, 10, 12, 13, 14 sont impliquées dans le cancer du sein. La KLK7 est impliquée dans les adénocarcinomes pancréatiques.^{33,83}

Les KLK tissulaires semblent posséder une activité dualiste car elles peuvent promouvoir ou inhiber la carcinogénèse. En effet, des analyses fonctionnelles ont mis en évidence les propriétés anti-tumorigènes de plusieurs KLK, incluant KLK3, KLK8 et KLK10.

Les propriétés anti-métastatiques de la KLK3 sont probablement liées à son activité anti-angiogénique. En effet, la KLK3 peut inhiber *in vitro* et *in vivo*, l'angiogénèse. Elle empêche par exemple, la migration des lignées cellulaires HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) induite par le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), qui est un puissant facteur angiogénique.⁸⁴ La KLK3 pourrait également supprimer la progression tumorale en activant le TGFβ (*transforming growth factor β*), un composant central des voies antimitotiques.⁸⁵ Le TGFβ est une cytokine capable de supprimer une tumeur en bloquant la prolifération et en induisant l'apoptose, dans les stades précoces de la tumorigénèse.

La KLK8 joue un rôle dans l'inhibition de l'invasion tumorale, du fait de sa capacité à modifier le microenvironnement extracellulaire en clivant la fibronectine. Ce clivage supprime en effet, la voie de signalisation des intégrines et altère la motilité des cellules cancéreuses par inhibition de la polymérisation de l'actine.⁸⁶

La KLK10 est considérée comme un gène suppresseur de tumeurs parce que la perte de son expression a été démontrée dans certains cancers.^{87,88} Par exemple, des études *in vitro* ont montré que l'expression de la KLK10 est drastiquement réduite chez les patientes atteintes du cancer du sein, tandis que son expression est normale chez les femmes en bonne santé. Le mécanisme qui gouverne la perte de l'expression de la KLK10 n'est pas tout à fait établi. Une hypothèse émise pour expliquer cette perte d'expression, est l'hyperméthylation de sa séquence promotrice.^{87, 88, 89}

Il existe d'autres kallikréines (KLK9, 13, 14) qui pourraient avoir un rôle de suppresseur de tumeurs par leur capacité à générer des facteurs angiostatiques qui sont généralement des fragments de protéines.^{33, 90} Par exemple, l'angiostatine est un facteur anti-angiogène libéré par clivage protéolytique à partir du plasminogène.⁹¹

Somme toute, d'innombrables études indiquent le lien entre une expression dérégulée des KLK et le processus de carcinogénèse. Les défis à relever consistent à traduire les données disponibles en perspectives cliniques, en favorisant l'utilisation potentielle des KLK comme biomarqueurs diagnostiques et pronostiques des cancers, ou comme cibles pour le développement de nouveaux traitements contre le cancer. Pour faire face à ce challenge, il est nécessaire de connaître le mode d'action des KLK.

III.2.3. Mode d'action des kallicréines tissulaires

Malgré la forte homologie structurale entre les KLK tissulaires, leur expression et leurs activités protéolytiques diffèrent. KLK3, KLK7 et KLK9 ont une activité *chymotrypsine-like* tandis que les autres KLK tissulaires possèdent une activité *trypsine-like*.⁹² Qu'elles agissent comme analogues de trypsine ou de chymotrypsine, le mécanisme d'action catalytique des KLK tissulaires est basé sur un positionnement des résidus d'acides aminés clés du site actif de façon à déclencher un mouvement de protons et de charges dans la poche enzymatique (Figure I- 16). Les analogues de trypsine clivent un lien peptidique à la suite d'un acide aminé chargé positivement (lysine, arginine), leur poche S1 étant étroite, profonde et chargée négativement. Les analogues de chymotrypsine, pour lesquels la poche S1 est large et de nature hydrophobe, sont spécifiques des résidus hydrophobes de taille moyenne ou grande (phenylalanine, tyrosine, leucine). Le mécanisme d'action catalytique est détaillé à la section I.2.2.

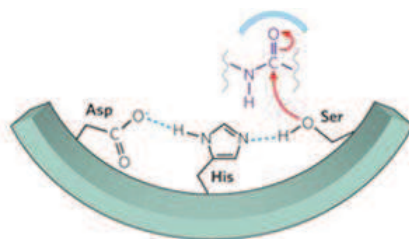


Figure I- 16 : Illustration de la triade catalytique des kallicréines tissulaires

La connaissance de la spécificité de substrats des KLK tissulaires est très importante pour l'identification d'inhibiteurs endogènes ou exogènes. Cette connaissance est d'autant plus utile qu'elle guide l'élaboration aussi bien de substrats synthétiques (substrats peptidiques fluorogéniques par exemple) que d'inhibiteurs hautement spécifiques pouvant conduire à des composés intéressants en clinique humaine.

III.2.4. Régulation de l'activité des KLK tissulaires

Lorsqu'elles sont physiologiquement nécessaires, les pro-KLK sont activées en KLK matures pour assurer leurs rôles physiologiques. Une fois le besoin de la cellule satisfait, les KLK doivent être inactivées pour éviter une action soutenue préjudiciable à l'intégrité de la cellule. Il existe différents types d'inhibiteurs identifiés à ce jour. Nous faisons ici un état de l'art des principaux inhibiteurs naturels des KLK tissulaires. Nous décrivons également les composés synthétiques développés à ce jour pour inhiber ces enzymes.

III.2.4.1. Inhibiteurs naturels

En règle générale, l'organisme utilise les principes de base qui gouvernent l'inhibition des protéases pour moduler l'action des kallicréines :

- L'atténuation qui repose sur une liaison réversible des inhibiteurs ;
- L'inhibition « KO » qui résulte d'une liaison irréversible de la molécule inhibitrice, impliquant souvent l'établissement d'une liaison covalente ;
- La compartimentation qui consiste en une localisation restreinte de l'enzyme ou de son inhibiteur dans un tissu ou organelle. Cela peut se faire par homo-oligomérisation de la protéase par elle-même, réduisant ainsi l'accessibilité du site actif.

Une grande variété d'inhibiteurs naturels sont actuellement connus, incluant de simples ions métalliques et des protéines complexes de plus de 700 kD.

III.2.4.1.1. Ions métalliques

Les principaux ions, régulateurs endogènes, sont de nature cationique (Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Na^+ , K^+). Ils stimulent souvent, pour la plupart d'entre eux, l'activité des protéases à sérine. Par exemple, le Zn^{2+} est un ion métallique (présent dans environ 300 enzymes humaines) capable de stimuler certaines protéases à sérine, et d'en inhiber d'autres. Des études rapportent que le Zn^{2+} pourrait inhiber plusieurs KLK tissulaires avec une affinité de l'ordre du micromolaire (KLK2, 3, 4, 5, 7, 8, 12, 14).^{23,90,93,94,95,96,97, 98} Il est considéré comme un « atténuateur » de l'activité des KLK en se liant de manière réversible pour procéder à l'inhibition.⁵⁷ Certaines études montrent un lien entre une réduction du taux de Zn^{2+} dans les tissus du cancer de la prostate et une activité accrue de la KLK3, suggérant ainsi l'action inhibitrice de Zn^{2+} à l'égard de la KLK3 prostatique.^{99, 100}

Le mécanisme d'inhibition des KLK par le Zn^{2+} est généralement de type non-compétitif. Cette inhibition non-compétitive est rendue possible grâce à des résidus histidines présents dans le voisinage du site catalytique. Par exemple, la KLK5 est inhibée par le Zn^{2+} grâce à deux résidus histidine présents en position 96 et 99 dans la poche S2 de l'enzyme. En absence d'inhibiteur, la triade catalytique (His57, Asp102 et Ser195) est parfaitement connectée dans le site actif *via* des liaisons hydrogène. En présence de l'ion Zn^{2+} , il y a une coordination de Zn^{2+} avec les résidus histidine (His96 et His99). On assiste ensuite à une rotation de la chaîne latérale de l'histidine 57 autour de la liaison $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ pour servir de troisième ligand pour le Zn^{2+} en dehors du site actif, perturbant alors la triade catalytique. L'enzyme se trouve ainsi inhibée. Dans cet état d'inhibition,

la poche enzymatique est toujours disponible pour reconnaître et accueillir un substrat. Toutefois, le substrat n'est pas dégradé parce que la triade catalytique est inactive, ce qui explique le caractère non-compétitif de cette inhibition.^{101,102,57}

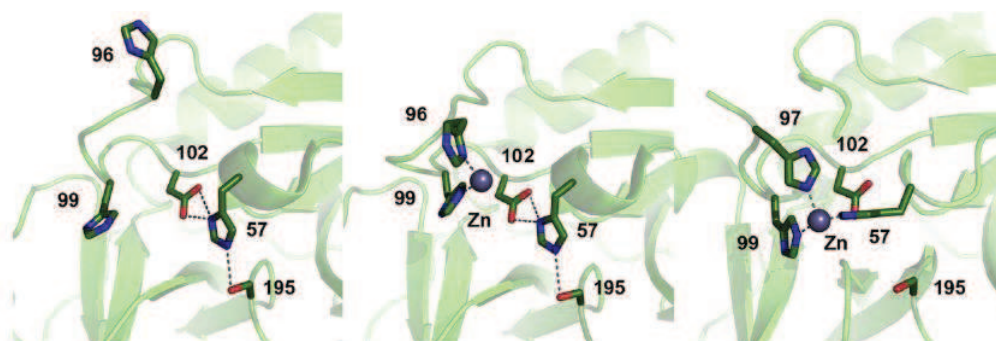


Figure I- 17 : Inhibition non-compétitive de la KLK5 par l'ion Zn^{2+}
*A gauche : absence d'inhibiteur ; Au milieu : Coordination de Zn^{2+} avec His96 et His99 ;
 A droite : His57 se relocalise pour former le troisième ligand du Zn^{2+}*

Le mécanisme d'inhibition de la KLK7 par le Cu^{2+} ou le Zn^{2+} est similaire à celui de la KLK5. Dans la KLK7, le résidu en position 96 est une thréonine. Dans ce cas, l'ion métallique se lie directement au résidu Histidine 99 et au carbonyle de la thréonine 96 en établissant des liaisons hydrogène *via* une molécule d'eau. La relocalisation de l'histidine 57 en dehors du site actif et sa coordination subséquente à l'ion métallique entraînent une réorganisation du site catalytique et une inhibition de l'enzyme. Comme dans le cas de la KLK5, l'enzyme peut accueillir un substrat sans pouvoir le dégrader.^{101, 102, 57}

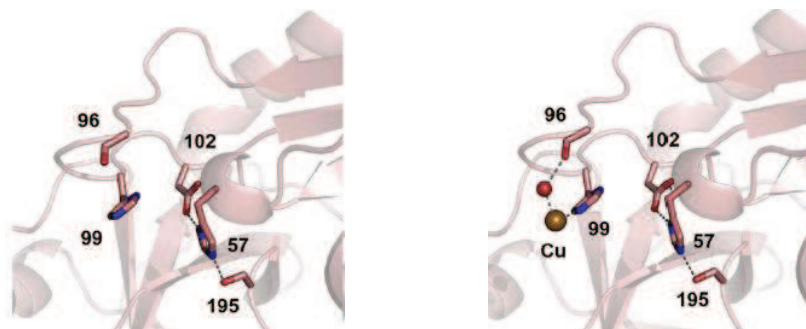


Figure I- 18 : Inhibition non-compétitive de la KLK7 par l'ion Cu^{2+}
*Gauche : absence d'inhibiteur ; Droite : Coordination de Cu^{2+} avec His99 et Thr96
 par l'intermédiaire d'une molécule d'eau.*

L'inhibition des KLK2 et 3 par le Zn^{2+} se fait aussi selon un mécanisme non-compétitif. Toutefois, une inhibition compétitive par le Zn^{2+} a également été décrite pour ces deux KLK. Cela peut s'expliquer par la possibilité pour ces KLK de fixer plusieurs ions Zn^{2+} par enzyme,

interférant par conséquent avec la reconnaissance du substrat.^{23,103} Il existe également des molécules naturelles protéiques capables d'inhiber les KLK tissulaires.

III.2.4.1.2. Inhibiteurs naturels protéiques

➤ Inhibiteurs protéiques endogènes

Les inhibiteurs protéiques endogènes les plus importants appartiennent au groupe des serpins, des inhibiteurs de type Kazal et des macroglobulines.

a- Serpines (*serine protease inhibitors*) : ce sont des protéines de 33 à 46 kDa, capables d'inhiber, par établissement d'un lien covalent, aussi bien les protéases à sérine que celles à cystéine. Leur mécanisme d'inhibition est basé sur un changement conformationnel des protéases cibles, déformant ainsi le site actif pour former un adduit covalent stable.²⁵ Les serpins possèdent une structure tridimensionnelle particulièrement conservée. Elles présentent en particulier 3 feuillets β (A, B et C), de 7 à 9 hélices α et possèdent une boucle mobile exposée à la surface de la protéine (Figure I- 19). Cette boucle, appelée *Reactive Center Loop* (RCL) constituée d'environ 17 acides aminés, est située entre les feuillets A et C et constitue le domaine de reconnaissance pour les protéases.¹⁰⁴

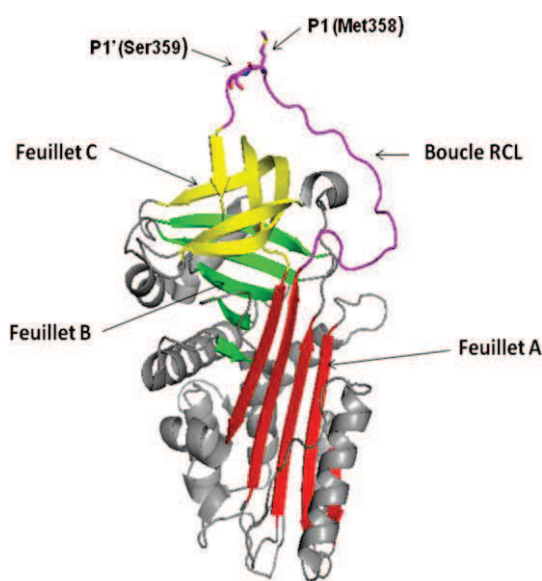


Figure I- 19 : Structure de la serpine α_1 -AT native (code PDB : 1QLP)
Adapté de G.A. Silvermann et al.¹⁰⁴

Lors de l'interaction serpine-protéase, la sérine réactive 195 de la protéase attaque la liaison amidique P1-P1' de la serpine (liaison Met358-Ser359)¹⁰⁵, conduisant à l'acylation de la protéase et à la formation de l'intermédiaire acyl-enzyme (Figure I- 20 (b)). Le côté N-terminal de

la boucle RCL vient alors s'insérer au sein du feuillet β -A de la serpine. Cette transition conformationnelle permet à la serpine de passer d'une conformation dite « stressée » (forme S) métastable à une forme thermodynamiquement plus stable, appelée forme « relaxée » (forme R). Cette transition S-R entraîne une translocation de la protéase du côté opposé de la serpine, sur une distance d'environ 70 Å (Figure I- 20 (c)). Ceci s'accompagne également d'une destruction de la protéase et une déformation de son site actif, prévenant de ce fait, l'hydrolyse de l'intermédiaire acyl-enzyme.¹⁰⁶ Le complexe est alors dégradé par protéolyse. Ainsi, les serpins agissent comme des inhibiteurs suicides.^{107,108,25}

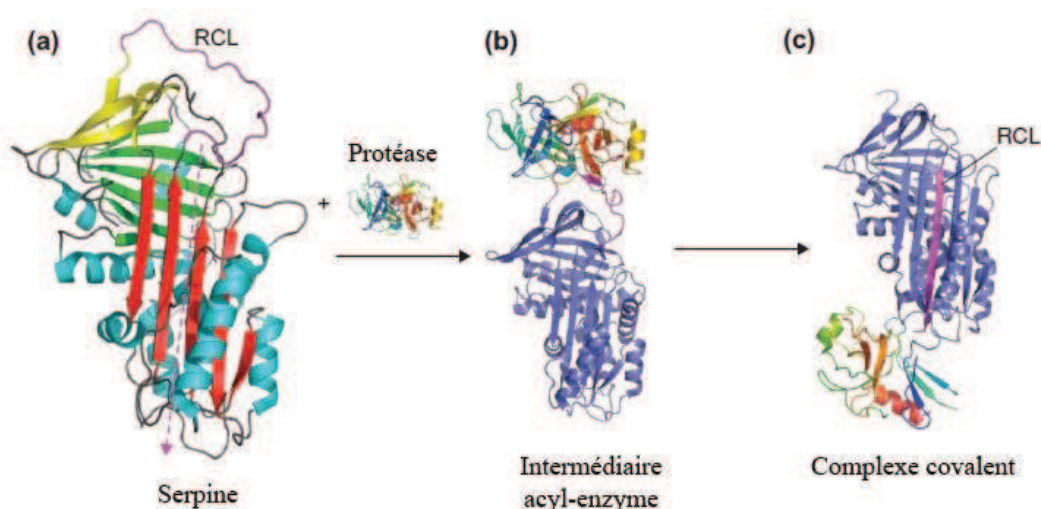


Figure I- 20 : Mécanisme d'inhibition des protéases par les serpins. (a) Serpine native. La boucle RCL apparaît en magenta. La flèche en pointillés indique le mouvement de la boucle après clivage, (b) Complexe de Michaelis, (c) Complexe serpine-protéase après translocation. Adapté d'après R. Law et al.¹⁰⁶

Quelques exemples de serpins et les kallikréines cibles correspondantes sont rapportées dans le Tableau I- 5.

<i>Serpines</i>	<i>Kallikréines cibles</i>
Kallistatine	KLK1, 7, 13, 14
α_1 -antitrypsine (α_1 .AT)	KLK1, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 14
α_1 -chymotrypsine (ACT)	KLK2, 3, 6, 7, 14
α_2 -antiplasmine (AP)	KLK2, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14
antithrombine III (AT)	KLK2, 3, 4, 6, 8, 12, 13, 14

Tableau I- 5 : Exemples de Serpines et leurs cibles

b- Les inhibiteurs de type Kazal : l'inhibiteur de Kazal est un peptide de 58 acides aminés, isolé des sécrétions pancréatiques. C'est un inhibiteur dont le résidu de reconnaissance P1 est chargé positivement. Il régule préférentiellement l'activité des protéases *trypsin-like*. Il a été

décrit pour la première fois par Kazal sous le nom d'inhibiteur de la trypsine pancréatique porcine (*Porcine Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor*). Il possède en particulier six résidus cystéines (Cys) qui sont essentiels à l'action inhibitrice. Ces derniers forment trois ponts disulfures entre les résidus cystéine Cys1-5, 2-4 et 3-6 et contribuent ainsi à la structure tridimensionnelle caractéristique de ces inhibiteurs. L'inhibiteur est également constitué d'une hélice α , d'un feuillet β et de plusieurs boucles peptidiques (Figure I- 21A). La structure peut être vue comme constituée de trois boucles A, B et C (Figure I- 21B). La boucle B possède, entre autres, les résidus P1 et P1' contribuant à la reconnaissance de l'inhibiteur par la protéase cible.¹⁰⁹

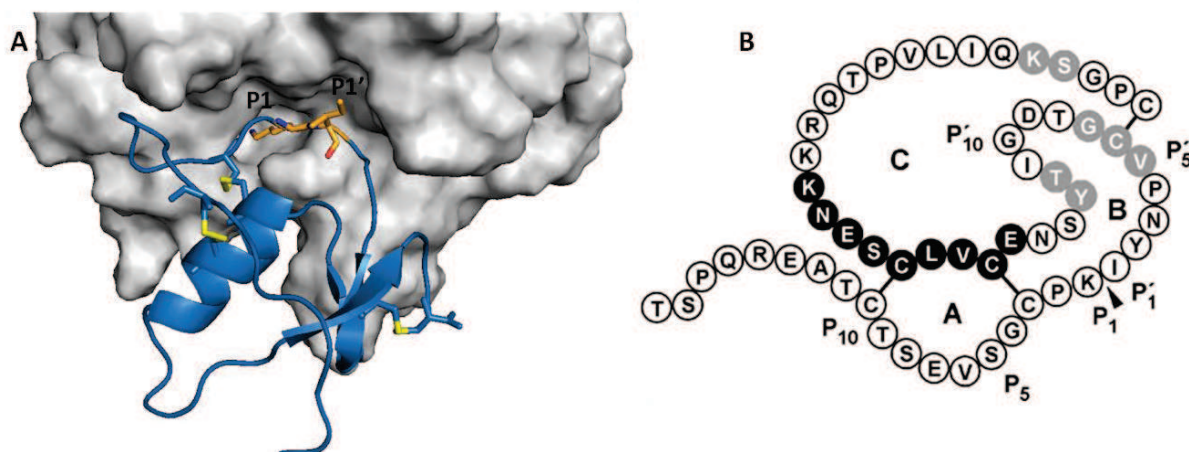


Figure I- 21 : Structure d'un inhibiteur de type Kazal. **A**-Inhibiteur de la trypsine pancréatique co-cristallisé avec le trypsinogène (Code PDB: 1TGS) : le trypsinogène apparaît en gris, l'inhibiteur en bleu. En jaune, sont représentés les trois ponts disulfures. En orange, apparaissent les résidus P1 et P1' de l'inhibiteur (lysine et isoleucine). **B**-Structure primaire de l'inhibiteur de la trypsine pancréatique. Sont représentées les trois boucles A, B et C. La liaison peptidique clivable est indiquée par une flèche.

Par la suite, des inhibiteurs ayant quelques similitudes avec cet inhibiteur ont été identifiés et dénommés « inhibiteurs de type Kazal. » Ils possèdent plusieurs domaines qui diffèrent entre eux par la nature des résidus qui les constituent et chaque domaine peut constituer un inhibiteur potentiel de sérine protéase. Le principal représentant de ce groupe est le LEKTI (*Lympho-Epithelial-Kazal-Type Inhibitor*). Il possède 15 domaines (D1 à D15), dont 2 domaines « Kazal », ayant une structure semblable aux inhibiteurs Kazal décrits plus haut. Ces deux domaines se caractérisent donc par la présence de six résidus cystéine, formant les trois ponts disulfures. Les 13 autres domaines sont dits « non Kazal ». Ils possèdent une homologie de structure avec les domaines précédents, mais ne sont constitués que de quatre résidus cystéine, engagés dans deux ponts disulfures.^{110, 111, 112} Excepté les domaines D1, D2, et D15, qui ont respectivement un résidu P1 glutamine (Gln), Acide aspartique (Asp) et lysine (Lys), les autres domaines du LEKTI ont un

résidu de reconnaissance P1 de type arginine. Ceci prédit la spécificité de reconnaissance des domaines par les protéases.^{113, 67, 114} Par exemple, le domaine 6 peut inhiber les KLK5 et 7. I. S. Fernandez et *al.* ont proposé un modèle d'interaction entre la KLK7 et le domaine D6 du LEKTI (LD6), basé à la fois sur la structure tridimensionnelle de la protéase cristallisée (code PDB 3BSQ) et la structure du LD6 résolue par RMN. Ils ont ainsi montré une parfaite complémentarité entre le site actif de KLK7 et les résidus de la boucle active de l'inhibiteur (Figure I- 22).¹¹⁵

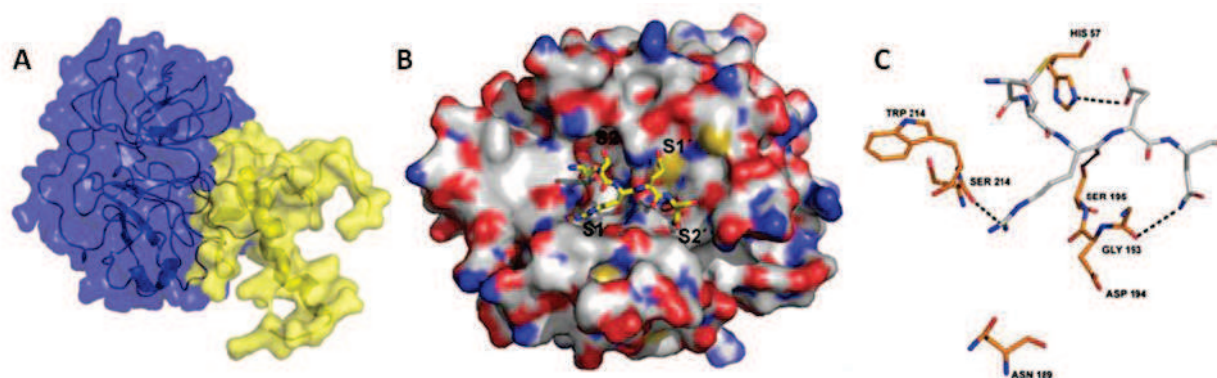


Figure I- 22 : Modèle moléculaire de l'interaction KLK7/LD6. A-Interaction entre les 2 protéines. B-Positionnement des résidus clés du LD6 dans le site actif de la KLK7. C- Interactions entre les résidus clés de la protéase et de son inhibiteur. Adapté de I. S. Fernandez et *al.*¹¹⁵

Par ailleurs, les domaines D9 à D12 du LEKTI inhibent la KLK5 (K_i entre 1 et 5 nM) mais pas la KLK7.¹¹¹ Le domaine 15 n'inhibe ni la KLK5, ni la KLK7.¹¹⁰ Le Tableau I- 7Tableau I- 6 présente les principales protéines identifiées dans ce groupe avec leurs cibles et les affinités correspondantes.^{116,117,57}

Protéine	Gène	K_i (nM)							
		KLK4	KLK5	KLK6	KLK7	KLK8	KLK12	KLK13	KLK14
LEKTI-1	SPINK5	-	< 6	20 - 410	11	-	-	20 - 410	< 3.5
LEKTI-2	SPINK9	-	65	-	-	-	-	-	-
SPINK6	SPINK6	27,3	1,33	140	1070	-	1	1	0,47

Tableau I- 6 : Principaux inhibiteurs de KLK tissulaires de type Kazal

c- Macroglobulines : le principal représentant de ce groupe est l' α_2 -macroglobuline (α_2 M ou A2M). C'est une glycoprotéine de 720 kDa, produite principalement par le foie. Elle se présente la plupart du temps sous la forme d'un tétramère formé par l'assemblage de deux paires de sous-unités identiques de 180 kDa, reliées entre elles par des ponts disulfure. Cette

macroglobuline est capable de former des complexes de stœchiométrie 1/1 ou 2/1 avec une large gamme de protéases (Figure I- 23).

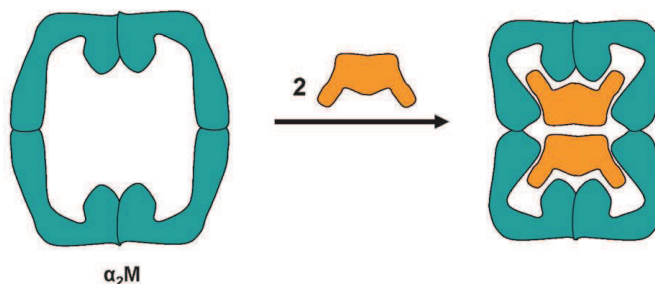


Figure I- 23 : Inhibition de protéases par un tétramère d' α_2M ¹¹⁸

Chaque sous-unité est caractérisée d'une part, par la présence d'une liaison thioester hautement réactive, et d'autre part par une région dite « région appât » (*bait region*) qui est reconnue par les protéases. L'interaction entre la protéase et la « région appât », exposée sous forme de boucle, entraîne le clivage d'un lien peptidique de la macroglobuline.¹¹⁹ La rupture des 4 « régions appât » conduit à un réarrangement conformationnel de la macroglobuline, qui piège la protéase selon un mécanisme dit « de la Dionée ou Vénus Attrape-mouche », plante carnivore de la famille des *Droseraceae*.^{120, 121} Le tétramère forme alors une cage qui emprisonne la protéase.¹²²

Le clivage des régions « appât » et le changement conformationnel subséquent expose alors le lien thioester, formé entre un résidu cystéine et glutamine de l'inhibiteur. Cette fonction thioester réagit alors avec la fonction amine d'une chaîne latérale d'une lysine, présente à la surface de la protéase piégée. La protéase est alors liée de manière covalente à son inhibiteur, *via* un lien amide. Ceci conduit ensuite à l'exposition, à la surface du tétramère, d'un nouveau domaine, appelé site de liaison aux récepteurs. Ce domaine présent au niveau C-terminal de chaque monomère, une fois exposé, est reconnu par des récepteurs cellulaires, comme le récepteur LRP1 (*Low density lipoprotein receptor-related protein 1*) et se lie au complexe. Il est à noter que le LRP1 n'est pas capable de reconnaître la macroglobuline native, mais uniquement le complexe protéase-macroglobuline. Le complexe est ensuite internalisé par endocytose et dégradé dans les lysosomes, assurant ainsi l'élimination de la protéase et de son cargo, quelques minutes après la formation du complexe.¹²³

L' α 2M peut inhiber les KLK tissulaires KKL1, 2, 3, 4, 5 et 13. Elle peut également se complexer avec toute autre protéase ayant un résidu lysine à sa surface, ce qui fait qu'elle est dépourvue de spécificité ; on dit donc que l' α 2M est un "inhibiteur panprotéase."^{124, 125}

➤ Inhibiteurs protéiques exogènes

Ce sont des analogues peptidiques de substrats isolés à partir de microorganismes (leupeptine, antipaïne, chymostatine)¹²⁶, de végétaux (SBTI, LBTI, BBI, SFTI-1) ou d'animaux (Aprotinine ou BPTI).

La leupeptine, l'antipaïne et la chymostatine sont des peptides aldéhydes dont la fonction aldéhyde réagit avec le résidu sérine catalytique des KLK. La leupeptine (acetyl-Leu-Leu-Arginal) et l'antipaïne (carboxyphenylethyl-carbamoyl-Arg-Val-Argininal) sont des inhibiteurs réversibles non sélectifs qui possèdent un résidu P1 de type arginine adapté à l'inhibition des KLK analogues de trypsine (KLK2, KLK5, KLK8).^{23,97} En effet, les KLK *trypsine-like* interagissent préférentiellement avec des substrats ayant un résidu P1 chargé positivement. La chymostatine est un térapeptide avec une partie Leucyl-Phenylalaninal qui a été décrite comme inhibant la KLK3. Son action sur les KLK *trypsine-like* (KLK8 et KLK14) a également été démontrée.¹²⁷

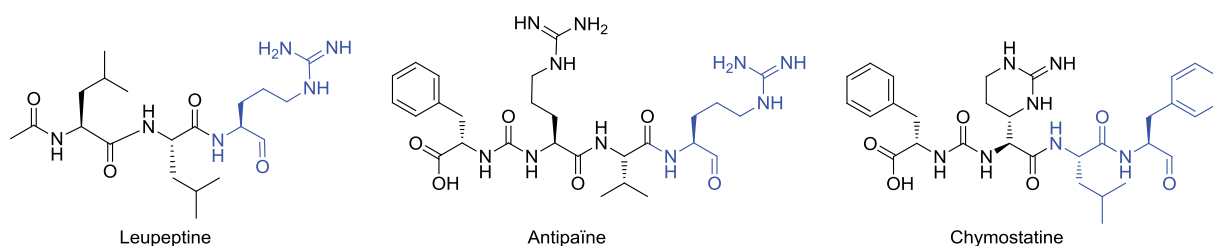


Figure I- 24 : Exemples d'inhibiteurs protéiques exogènes

Les inhibiteurs polypeptidiques d'origine végétale et animale sont pour la plupart de type Kunitz. Les plus courants sont le *soybean trypsin inhibitor* (SBTI), le *lima bean trypsin inhibitor* (LBTI), le *Bowman-Birk inhibitor* (BBI). Ils sont ainsi nommés car ils possèdent des caractéristiques structurales et fonctionnelles, proches de celles de l'inhibiteur de Kunitz.¹²⁸ L'inhibiteur de Kunitz est un inhibiteur polypeptidique plasmatique appelé également BPTI (*bovine basic pancreatic trypsin inhibitor*) ou aprotinine. Décrit pour la première fois par Kunitz dont il porte le nom, le BPTI est capable d'interagir avec des enzymes de type protéase à sérine. L'aprotinine ou le BPTI mature est un polypeptide de 6512 Da synthétisé au niveau du poumon, des glandes parotides, et du pancréas d'où il est extrait. Il est constitué d'une seule chaîne de 58

acides aminés, repliée sur elle-même et stabilisée par trois ponts disulfures. C'est un inhibiteur covalent dont le résidu de reconnaissance P1 est une lysine.^{129, 130} Il inhibe principalement les KLK analogues de trypsine (KLK1, 2, 4, 5, 12, 14).^{131,127,98,23} Le mode de liaison de l'aprotinine à la KLK est similaire à celui de l'hirustasine que nous décrirons ci-après.

Le *soybean trypsin inhibitor* (SBTI) est une protéine de 20 kDa constituée d'une chaîne polypeptidique de 181 résidus d'acides aminés repliée sur elle-même et stabilisée par deux ponts disulfures. Il peut inhiber les KLK tissulaires 4, 5, 6 et 14 selon le même mode d'action que l'hirustasine. Le résidu P1 du SBTI est une arginine.^{132, 133}

L'hirustasine est un autre exemple d'inhibiteur naturel polypeptidique. C'est un peptide de 55 acides aminés, isolé à partir d'extraits de sangsue médicinale ou sangsue officinale (*Hirudo medicinalis*). L'hirustasine est un inhibiteur covalent des KLK tissulaires ($K_i = 13$ nM pour la KKL1). Elle n'est pas sélective car elle peut inhiber la cathepsine G ($K_i = 2,9$ nM), la plasmine ($K_i = 139$ nM), la trypsine bovine ($K_i = 7$ nM) et la chymotrypsine bovine ($K_i = 6,4$ nM). La reconnaissance de l'hirustasine par la KKL est possible grâce à la formation d'un feuillet bêta antiparallèle entre l'enzyme et l'inhibiteur. Le résidu P1 de l'hirustasine est une Arginine (Arg30) qui interagit avec un résidu chargé négativement, présent au fond de la poche enzymatique. La chaîne latérale du résidu P4 (Val27) est accueillie par une poche en périphérie du site actif.¹³⁴ D'autre part, la chaîne latérale du résidu P5 (Glu 26) forme un pont salin avec la chaîne latérale d'une histidine (différente de l'histidine catalytique) de la KKL. La présence d'un résidu arginine en P2' (Arg32) donne lieu à des interactions supplémentaires, entre la fonction guanidine positivement chargée, et les électrons π d'une chaîne latérale aromatique de l'enzyme. Ces interactions additionnelles expliquent la spécificité de reconnaissance des KKL par l'hirustasine par rapport à d'autres enzymes telles que le facteur de coagulation Xa.¹³⁴

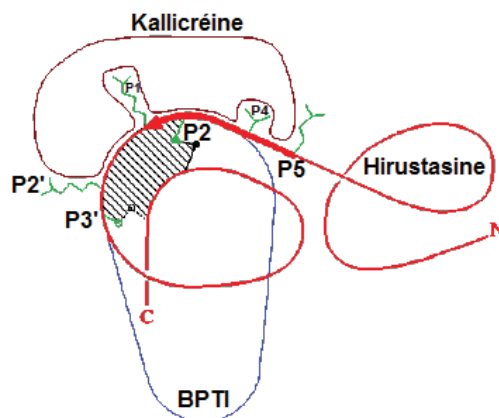


Figure I- 25 : Superposition schématique de l'hirustasine (rouge) et du BPTI (bleu)
 La partie hydrophobe est rayée. Les résidus P3', P2', P1, P2, P4 et P5 sont représentés (vert).
 Les poches accueillant les résidus P1 et P4 de la kallistéine sont indiquées.

Les inhibiteurs ci-dessus décrits sont peu sélectifs. Toutefois, leur utilisation pour des études biochimiques a permis de comprendre les différents mécanismes d'inhibition. Les données obtenues dans le cadre de ces études biochimiques, ainsi que l'utilisation potentielle des KLK comme cibles thérapeutiques ont suscité un intérêt considérable dans le développement d'inhibiteurs pharmacologiques.

III.2.4.2. Inhibiteurs synthétiques des KLK tissulaires

Plusieurs molécules synthétiques ont été décrites à ce jour comme des inhibiteurs des KLK tissulaires. Ce sont de petites molécules ou des analogues de substrats de type peptidique utilisés la plupart du temps pour déterminer la spécificité de substrat des KLK. Nous présentons ici, d'une manière non exhaustive, quelques inhibiteurs synthétiques des KLK tissulaires. Nous discuterons de façon plus détaillée des composés capables d'inhiber la KLK7, dans la section IV.5.

Les dérivés fluorures de sulfonyl (AEBSF, PMSF)^{135,136} sont décrits comme des inhibiteurs covalents de certaines KLK. Par exemple, le fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) est capable d'inhiber la KLK1. La KLK3 peut être inhibée par le chlorhydrate de fluorure de 4-(2-aminoéthyl)benzènesulfonyl (AEBSF) et le PMSF.¹³⁷

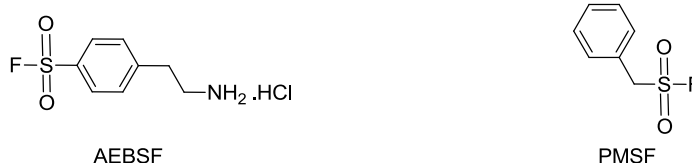


Figure I- 26 : Exemples de dérivés fluorures de sulfonyl, inhibiteurs synthétiques de KLK tissulaires

Les peptides de type chlorométhyl-cétone sont capables d'inhiber les KLK de façon covalente.¹³⁸ C'est le cas de la tosyl-lysyl chlorométhyl-cétone (TLCK), un inhibiteur covalent des KLK1, 4, 8 ou de la D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginyl-chlorométhyl- cétone (PPACK), un inhibiteur de la KLK2.^{139, 97, 23}

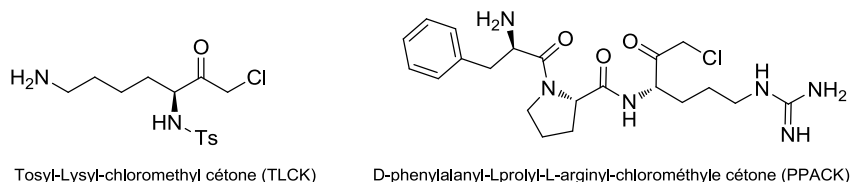


Figure I- 27 : Exemples de dérivés chlorométhyl-cétone, inhibiteurs synthétiques de KLK tissulaires

Des peptides de type boronique ont été également développés comme des inhibiteurs de la KLK3. L'inhibition est basée sur la possibilité pour ces composés, de mimer l'état de transition tétraédrique qui est observé lors de l'hydrolyse des substrats peptidiques par les protéases à sérine. Les résidus P3-P1 du peptide boronique forment un feuillet β antiparallèle avec les résidus des sous-sites correspondants S3-S1 de la KLK3. La partie boronique en C-terminal se lie de manière à mimer l'état de transition. Il s'établit une liaison hydrogène entre l'oxygène déprotoné du motif boronique et l'azote N_ϵ de l'histidine catalytique tandis que le groupe hydroxyle du motif boronique s'oriente dans le trou de l'oxyanion.¹⁴⁰

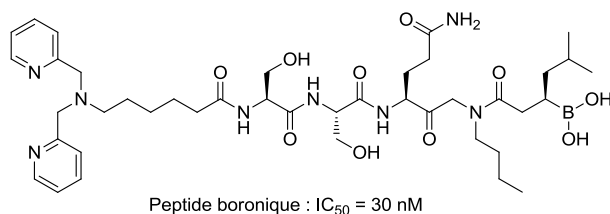
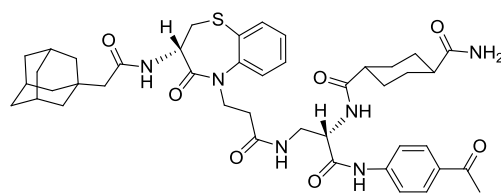


Figure I- 28 : Peptide boronique, inhibiteur de la KLK3

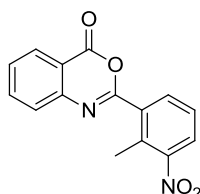
Des inhibiteurs non peptidiques ont été également décrits. C. Olivier et *al.* ont mis au point à partir d'un motif 5-(carboxyéthyl)-2,3-dihydro-1,5-benzothiazépin-4-one des composés pseudopeptidiques capables d'inhiber la kallikréine tissulaire 1. Le composé ci-dessous représenté possède la meilleure affinité ($K_i = 0,7 \mu M$) à l'égard de la KLK1. Il est à noter que ce composé n'est pas sélectif de la KLK1 dans la mesure où il inhibe également la KLK plasmatique.¹⁴¹



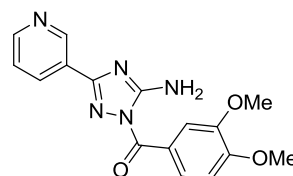
Pseudopeptide avec un motif benzothiazépine

Figure I- 29 : Pseudopeptide à motif benzothiazépinone, inhibiteur de KLK tissulaires

En 2008, H. Koistinen et *al.* ont identifié des composés benzoxazinones et 1,2,4-triazoles comme deux familles d'inhibiteurs de la KLK3 avec des concentrations inhibitrices submicromolaires sans pour autant être sélectifs. Les composés triazoles agissent comme des inhibiteurs compétitifs réversibles de la KLK3 tandis que l'effet inhibiteur des benzoxazinones est beaucoup plus stable voire irréversible.¹⁴²



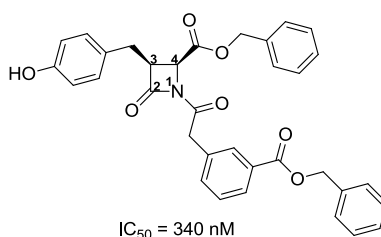
Dérivé benzoxazinone ; $IC_{50} = 0,3 \mu M$



Dérivé triazole ; $IC_{50} = 0,5 \mu M$

Figure I- 30 : Exemples de benzoxazinone et de triazole, inhibiteurs synthétiques de KLK tissulaires

P. Singh et *al.* ont également décrit en 2008, des dérivés β -lactames capables d'inhiber la KLK3 de manière covalente, avec des IC_{50} allant de $0,34 \mu M$ à plus de $30 \mu M$. Il est à noter que les valeurs des IC_{50} observées correspondent au mélange racémique des énantiomères. La structure du meilleur inhibiteur est représentée dans la Figure I- 31.¹⁴³



$IC_{50} = 340 \text{ nM}$

Figure I- 31 : Dérivé β -lactame, inhibiteur de la KLK3

L'inhibition par les β -lactames s'effectue de la manière suivante. Dans un premier temps, le composé β -lactame réalise des interactions non covalentes au voisinage des résidus de la triade catalytique (Ser195, Asp102, His57). Le substituant en C-3 se positionne dans la poche de spécificité S1, tandis que le groupe carbonyle en C-2 s'oriente vers le trou de l'oxyanion de

l'enzyme (Figure I- 32A). Ceci favorise l'attaque nucléophile de l'hydroxyle de la sérine 195 sur le cycle β -lactame, dont l'ouverture conduit à un état de transition avec formation d'une liaison covalente entre le résidu Ser195 et le carbone C-2 (Figure I- 32B). Dans le cas de l'hydrolyse d'un substrat peptidique classique, l'intermédiaire covalent formé après clivage de la liaison peptidique peut se dissocier pour restituer l'enzyme active, *via* l'attaque d'une molécule d'eau sur l'acyl-enzyme naissant. Par contre, pour les inhibiteurs de type β -lactames, l'intermédiaire ainsi formé se comporte différemment. En effet, l'ouverture du cycle lactame s'accompagne d'une réorganisation conformationnelle, permettant l'établissement d'une liaison hydrogène entre l'amine NH-1 du lactame et l'azote de l'histidine 57 (Figure I- 32C). Cette réorganisation conduit à un complexe acyl-enzyme stable et entraîne par conséquent, une inhibition durable de l'enzyme.

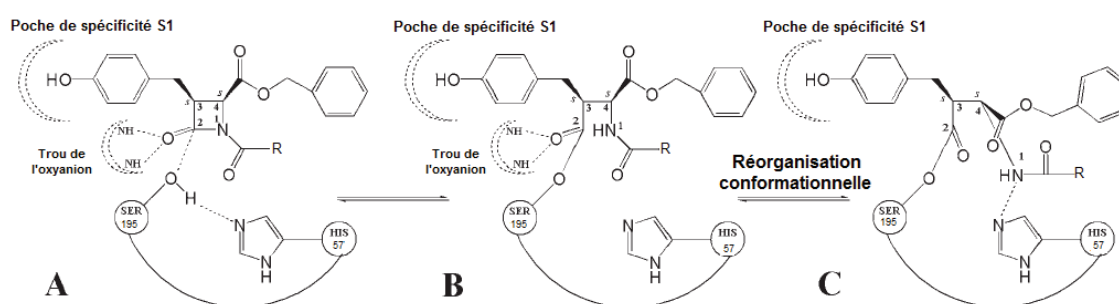


Figure I- 32 : États conformationnels clés lors de la liaison du composé β -lactame au site catalytique de la KLK3. (A) Complexe initial non covalent. (B) Complexe intermédiaire covalent. (C) Réorganisation conformationnelle à l'origine d'un complexe acyl-enzyme stable (adapté d'après P. Singh et *al.*¹⁴³).

En 2012, G. Liang et *al.* ont identifié des inhibiteurs de la KLK6 incorporant un motif *para*-amidobenzylamine, sans précision de leur sélectivité. Le composé ci-dessous représenté possède une IC_{50} de 300 nM à l'égard de la KLK6.¹⁴⁴

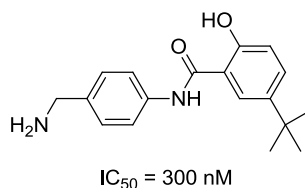


Figure I- 33 : Dérivé *p*-amidobenzylamine, inhibiteur de la KLK6

La plupart des molécules actuellement décrites, montrent une faible sélectivité à l'égard des kallikréines pour certaines, et possèdent des propriétés physico-chimiques peu adaptées à une utilisation *in vivo* pour d'autres. La synthèse de composés biocompatibles est donc une nécessité. Même si leurs implications dans certaines maladies ne sont pas toujours clairement élucidées, les

kallicroïnes restent des outils importants de diagnostic/pronostic de nombreuses pathologies et constituent à cet effet, des cibles thérapeutiques potentielles.

Dans le cadre de cette étude, nous nous intéresserons particulièrement à la kallicroïne humaine 7 (KLK7). Nous rappellerons tout d'abord les fonctions physiologiques et les caractéristiques biochimiques de cette protéase. Ensuite, nous présenterons les travaux effectués à ce jour pour identifier des molécules capables de moduler son action.

IV. LA KALLICRÉINE HUMAINE 7

La kallicroïne humaine 7 (KLK7) est une endopeptidase *chymotrypsine-like* dont l'activité catalytique implique un résidu sérine. Initialement obtenue à partir d'un clonage provenant de la couche cornée de la peau humaine, la KLK7 était connue sous l'appellation « enzyme chymotrypsique de la couche cornée » (SCCE, *stratum corneum chymotryptic enzyme*).¹⁴⁵ En 2008, I. S. Fernandez et *al.* ont décrit la production de la KLK7 dans sa conformation native à partir de la bactérie *Escherichia coli*.¹¹⁵ Afin d'aider à la compréhension du rôle de KLK7 dans les processus physiologiques et pathologiques, nous présentons ci-après, une brève description de la peau avec les constituants principaux qui l'aident à maintenir sa structure et sa fonction.

IV.1. La peau

La peau est l'organe le plus étendu du corps humain, représentant 10 % de la masse corporelle humaine (2 m² pour 5 kg) et dont l'épaisseur totale est de 2,5 mm. Elle est composée de trois compartiments majeurs : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Nous nous intéressons ici à l'épiderme qui est la couche la plus superficielle (en contact direct avec l'environnement) et qui joue le rôle de barrière, protégeant ainsi l'organisme des agressions extérieures.

➤ L'épiderme

L'épiderme est un épithélium pluristratifié, de 0,5 mm environ d'épaisseur, en perpétuel renouvellement. Le cycle de renouvellement dure environ 28 jours. De la couche la plus profonde à la plus externe, on distingue : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse, la couche claire et la couche cornée (Figure I- 34).

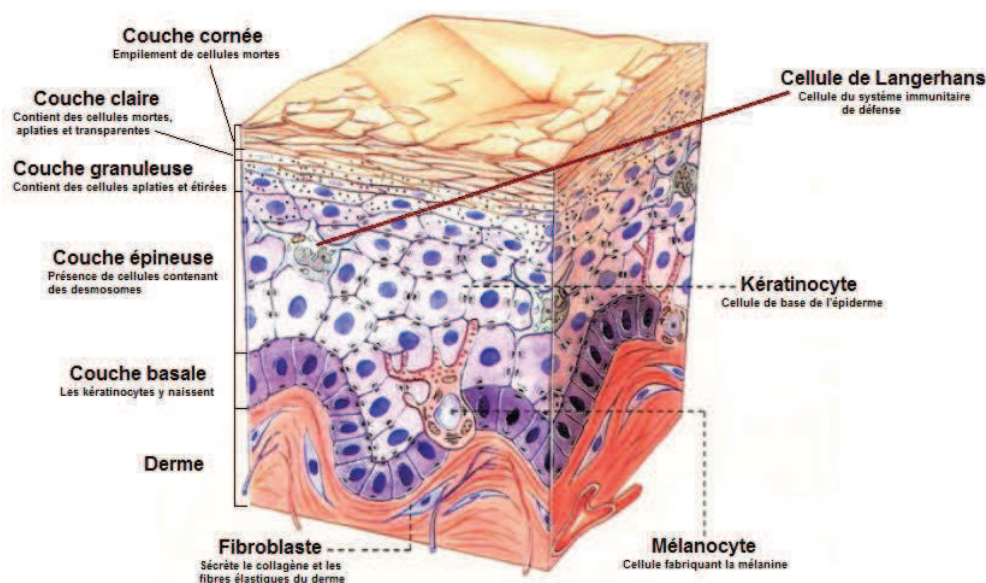


Figure I- 34 : structure de l'épiderme (adapté d'après référence 146)

Les kératinocytes synthétisés dans la couche basale, remontent vers la surface en se transformant en cornéocytes, lesquels constituent la couche cornée. Les cornéocytes les plus superficiels sont destinés à être éliminés lors de la desquamation. Au cours de ce processus, des enzymes protéolytiques sécrétées par les kératinosomes dans l'espace intercornéocyttaire vont progressivement dégrader les structures d'adhésion (cornéodesmosomes). Parmi ces enzymes on retrouve les protéases à sérine dont les kallikréines 5 et 7.⁶⁷

IV.2. Fonctions physiologiques de la KLK7

Chez le sujet sain, la KLK7 intervient dans la desquamation de la peau par la dégradation des structures intercellulaires telles que les desmosomes, structures de jonction des cornéocytes.¹⁴⁷ La KLK7 peut subir une activation protéolytique par des enzymes *trypsine-like* telles que la KLK5.^{127,148} La KLK5 a la propriété non seulement d'activer la KLK7 mais aussi de s'autoactiver. Par ailleurs, la KLK5 peut activer les phospholipases A2. Cette activation conduit à la synthèse de prostaglandines, médiateurs chimiques de l'inflammation et à la sécrétion prématurée de corps lamellaires, c'est-à-dire à la formation de structures lipidiques immatures. Ce dernier phénomène semble résulter de l'activation des récepteurs PAR-2 (*protease-activated-receptor 2*) par la KLK5 suivie de l'activation des enzymes phospholipases A2.^{149,150}

Une fois activée, la KLK7 est capable de dégrader la desmoglérine-1, la desmocolline-1 et la cornéodesmosine. La dégradation de ces protéines est requise dans le processus de la

desquamation. La KLK7 joue également un rôle dans l'inflammation du fait de sa capacité à activer les cytokines proinflammatoires, telles que l'interleukine-1 β (*IL-1 β*).¹⁵¹ Lorsque l'activité de la KLK7 n'est pas régulée, elle peut entraîner des anomalies de la peau incluant la kératinisation pathologique, le psoriasis, et les réactions inflammatoires.¹⁵² De ce fait, la KLK7 constitue une cible intéressante dans la connaissance et la prise en charge des désordres cutanés.

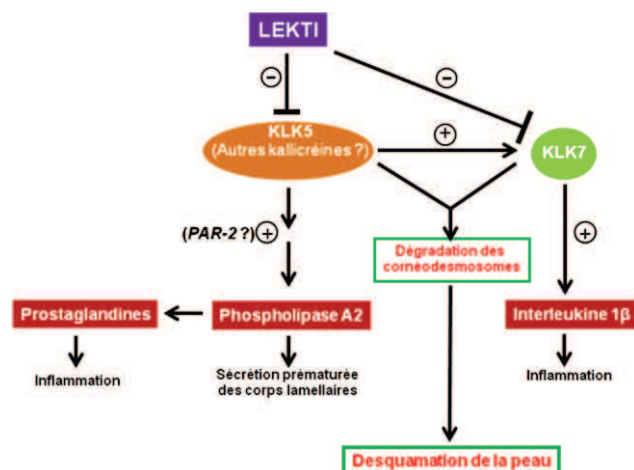


Figure I- 35 : Rôles de la KLK7 dans les processus de desquamation et d'inflammation et régulation de son activité par LEKTI. *PAR-2* = *Protease activated receptor 2*. (Illustration d'après T. Egelrud et *al.*⁶⁶).

IV.3. La KLK7 en tant que cible thérapeutique

Des études récentes ont établi un lien entre la surexpression de la KLK7 et les maladies inflammatoires de la peau telles que les dermatites atopiques, le psoriasis, le Syndrome de Netherton, du fait de sa capacité à dégrader le domaine extracellulaire des *E*-cadhérines. D'autre part, une expression aberrante de la KLK7 est associée à certaines formes de tumeurs chez l'homme.⁵⁴

IV.3.1. Implication de la KLK7 dans les dermatoses

L'homéostasie épidermique repose sur le contrôle de la prolifération, de la différenciation des kératinocytes et de leur élimination par desquamation. Des perturbations au niveau de ces mécanismes peuvent conduire à des processus pathologiques.

Nous décrivons ici, deux exemples d'affections dermatologiques pour lesquelles un lien avec une hyperactivité de la KLK7 a été établi, du fait d'un manque de modulation de son activité : le Psoriasis et le Syndrome de Netherton.

IV.3.1.1. Psoriasis

Le psoriasis est une maladie auto-immune chronique et bénigne de la peau ayant pour étiologie une prédisposition génétique et des facteurs favorisants environnementaux (stress, micro-organismes, etc.). Il est caractérisé par des lésions de la peau, causées par une hyperprolifération épidermique et une maturation précoce des kératinocytes, ce qui entraîne une kératinisation incomplète (Figure I- 36A et B). Cette dermatose est fréquente, aussi bien chez l'homme que chez la femme et touche approximativement 2% de la population mondiale.¹⁵³ La maladie n'est pas contagieuse mais avec des démangeaisons douloureuses et des plaies pouvant atteindre plus de 10% de la surface corporelle, elle altère considérablement la qualité de vie des malades.

En mai 2014, l'Organisation Mondiale de la Santé a reconnu le psoriasis comme maladie chronique douloureuse et invalidante et considère que les malades sont exposés à un risque relativement plus élevé de cardiopathie, d'accident vasculaire cérébral, d'hypertension et de diabète. Des études rapportent que les taux de dépression et d'anxiété sont plus élevés chez les personnes atteintes de psoriasis que dans la population générale.¹⁵⁴

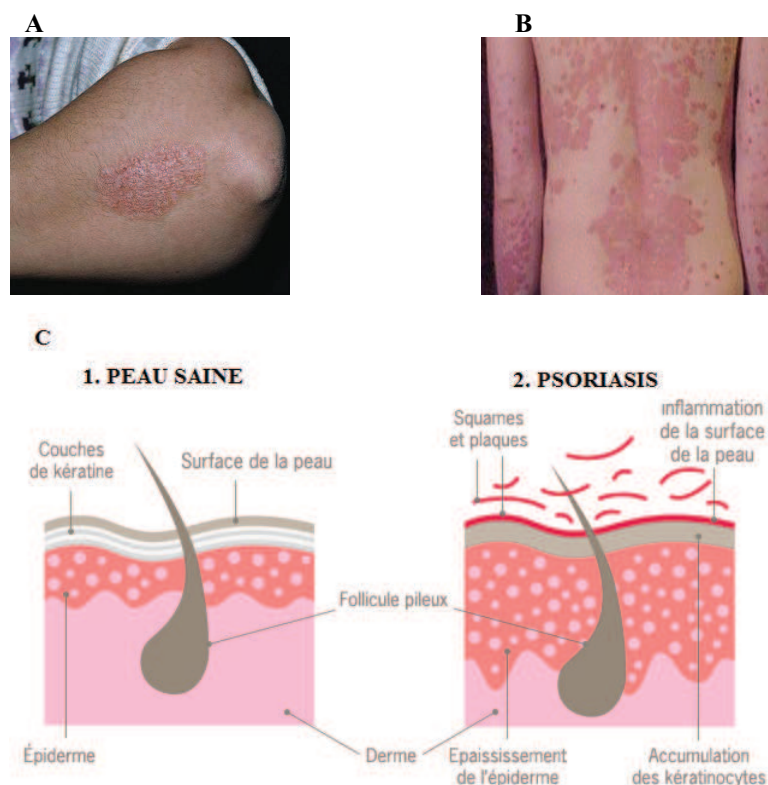


Figure I- 36 : Manifestations cliniques du Psoriasis

A- et B- Manifestations cliniques du Psoriasis. **C-** Représentation schématique de la peau : (1) Peau normale ; (2) Psoriasis caractérisé par un épaississement de la peau et des squames.

IV.3.1.2. Syndrome de Netherton

Le Syndrome de Netherton (OMIM 256500ⁱⁱⁱ) est une génodermatose rare et sévère, transmise selon le mode autosomique récessif. Il s'agit d'une érythrodermie ichtyosiforme congénitale associée à une dysplasie pileuse spécifique (*Trichorrhexis invaginata*) et à la présence de manifestations atopiques constantes.¹⁵⁵ Il en résulte une inflammation chronique de la peau, prédisposant les sujets atteints à la déshydratation, à la septicémie et à des infections mortelles.

Cette maladie est due aux mutations du gène SPINK5 qui code pour l'inhibiteur de protéases à sérine « LEKTI ». La conséquence de l'absence du LEKTI est l'élévation de l'activité de KLK5 et KLK7 avec une dégradation prématurée des cornéodesmosomes dans la couche cornée basale de l'épiderme. Les manifestations cliniques qui caractérisent le Syndrome de Netherton sont des poussées inflammatoires (peau rouge et prurigineuse, desquamation parfois en grands lambeaux), des anomalies des cheveux (alternance de pousses et de chutes de cheveux de mauvaise qualité), des allergies (Figure I- 37).



Figure I- 37 : Décollement de la couche cornée.

A- Décollements superficiels étendus de la peau des souris *Spink5*^{-/-} (KO) (dès leur naissance). **B-** La coloration par hématoxyline/éosine de coupes de peau montre une séparation entre la couche granuleuse (CG) et la couche cornée (CC) de l'épiderme chez les souris *Spink5*^{-/-}. CB : couche basale ; CE : couche épineuse ; WT : souris sauvage.¹⁵⁶
C- et D- Manifestations cliniques du Syndrome de Netherton.^{157,158}

Outre le rôle bien établi de la KLK7 dans les atteintes dermatologiques, l'expression aberrante et la sécrétion de KLK7 dans les tumeurs chez l'homme pourraient également contribuer à la dissémination métastatique de certains cancers.

ⁱⁱⁱ Numéro de description phénotypique du Syndrome de Netherton dans le catalogue OMIM (Online Mendelian inheritance in Man).

IV.3.2. Implication de la KLK7 dans les cancers

L. G. Kyriakopoulou et *al.* ont montré que la détection de KLK7 dans le sérum est un marqueur défavorable, chez les patientes atteintes du cancer de l'ovaire, du sein, ou du col de l'utérus.¹⁵⁹

Dans leurs études sur le rôle de KLK7 dans le cancer, L. Mo et *al.* ont montré que la KLK7 favorisait l'invasion et les métastases, par l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules du carcinome prostatique.¹⁶⁰

Une surexpression de la KLK7 dans le cancer du pancréas a été rapportée par S. K. Johnson. En effet, une perte de l'adhérence des protéines cadhérines a été démontrée dans le cancer pancréatique. Ceci pourrait expliquer l'implication de la KLK7 dans ce cancer, du fait de sa capacité à cliver les cadhérines qui maintiennent l'adhésion intercellulaire.⁸³ La perte d'adhérence constitue l'un des premiers événements qui conduisent à la diffusion de la tumeur et l'apparition de la métastase.^{161, 147}

Au regard de tout ce qui précède, la KLK7 représente une cible thérapeutique pour les pathologies cutanées et cancéreuses. Pour réussir à développer des inhibiteurs sélectifs de la KLK7, il est nécessaire de connaître les caractéristiques biochimiques de cette enzyme.

IV.4. Caractéristiques biochimiques de la KLK7

La KLK7 est formée d'une seule chaîne polypeptidique et sécrétée sous forme de pré-pro-enzyme ; elle est activée dans le milieu extracellulaire par catalyse protéolytique avec libération du propeptide. En 1994, L. Hansson et *al.* ont identifié la KLK7 comme étant une protéine de 253 acides aminés, constituée d'un peptide signal de 22 aminoacides, d'un propeptide de 7 aminoacides, suivi d'une séquence correspondant à l'enzyme active.¹⁶²

La chaîne polypeptidique de la KLK7 se replie en deux tonneaux β adjacents formés chacun de six brins. La poche catalytique S1 de la KLK7 est large et hydrophobe, ayant une préférence pour les résidus hydrophobes de taille moyenne ou grande de type tyrosine, phénylalanine ou leucine.⁹⁶

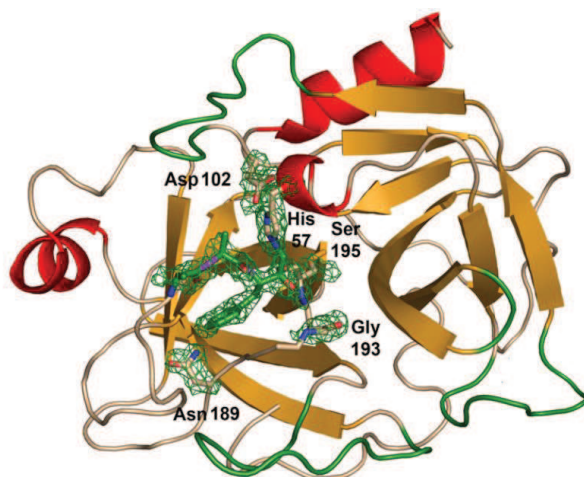


Figure I- 38 : Structure tridimensionnelle de la KLK7 en ruban avec les résidus catalytiques, et un inhibiteur Ala-Ala-Phe-Chlorométhyl-cétone (en bâtonnets). La densité électronique entourant l'inhibiteur est représentée en vert (M. Debela et *al.*⁹⁶).

➤ Spécificité des poches adjacentes

La KLK7 est caractérisée par la présence d'un résidu polaire asparagine (Asn189) au fond de sa poche de spécificité S1. L'entrée de la poche est délimitée de part et d'autre, par les chaînes latérales du résidu hydrophobe Phe218 et du résidu polaire Asp192. C'est une poche large mais moins profonde que la poche de spécificité de la chymotrypsine. Les résidus P1 que la poche S1 préfère accueillir sont les chaînes latérales de taille moyenne, telles que celles de la Tyrosine (Tyr), l'Alanine (Ala), la Méthionine (Met), et la Norleucine (Nle).

Les poches adjacentes à la poche S1 sont également impliquées dans la spécificité de reconnaissance des substrats par la KLK7. Ainsi, la poche S2 a une préférence pour le résidu Tyr, puis pour les résidus hydrophobes de taille moyenne Leu, Nle, Thr, Met, Phe, tandis que la taille du résidu Gly n'est pas adaptée. Les poches S3 et S4 acceptent presque tous types de résidus avec une légère préférence pour les chaînes latérales hydrophobes.⁹⁵ En référence à la base de données MEROPS, la poche S1' de la KLK7 accueille par ordre décroissant de préférence un résidu P1' de type isoleucine (Ile), Leu, et Arg. De la même façon, la poche S2' a une préférence pour un résidu P2' de type valine (Val) et Arg, tandis que la poche S3' préfère un résidu P3' de type Gly, Trp ou Lys. La poche S4' interagit de préférence avec un résidu P4' de type Gly, Ala ou Lys.¹⁶³

IV.5. Inhibiteurs de la KLK7

Dans les conditions physiologiques, l'activité de la KLK7 est modulée par des inhibiteurs endogènes de nature peptidique, ou par des ions métalliques. Des composés synthétiques ont été

développés comme outils biochimiques afin de mieux étudier l'implication de cette enzyme dans divers processus physiopathologiques. D'autre part, plusieurs groupes se sont impliqués dans la recherche de petites molécules pour obtenir des inhibiteurs utilisables en thérapeutique.

IV.5.1. Inhibiteurs naturels

L'activité enzymatique de la KLK7 est inhibée par les ions métalliques Zn^{2+} et Cu^{2+} , à des concentrations micromolaires ($IC_{50} < 10 \mu M$). Outre les ions métalliques, il existe des inhibiteurs endogènes protéiques de la KLK7 qui sont des serpins ou des inhibiteurs de type Kazal. Le mécanisme d'action inhibitrice de ces molécules est décrit dans la section III.2.4.1.

L' α_1 -antitrypsine, l' α_1 -antichymotrypsine, l'inhibiteur de protéase C (PCI), la kallistatine et l' α_2 -antiplasmine sont des exemples de serpins qui peuvent inactiver la KLK7. Excepté l' α_2 -antiplasmine qui agit à des concentrations nanomolaires, les autres inhibiteurs de cette liste inhibent la KLK7 à des concentrations picomolaires. Le LEKTI-1 diminue l'activité protéolytique de la KLK7 à une concentration nanomolaire.

Récemment, P. Krastel et *al.* ont breveté des depsipeptides cycliques capables d'inhiber la KLK7 ($IC_{50} = 0,4 \text{ nM}$ à 6 nM). Ces composés, isolés de la bactérie *Chondromyces crocatus* appartenant à l'ordre des Myxococcales, sont caractérisés par un manque de sélectivité car ils peuvent également inhiber d'autres protéases (chymotrypsine, élastase neutrophile humaine).¹⁶⁴

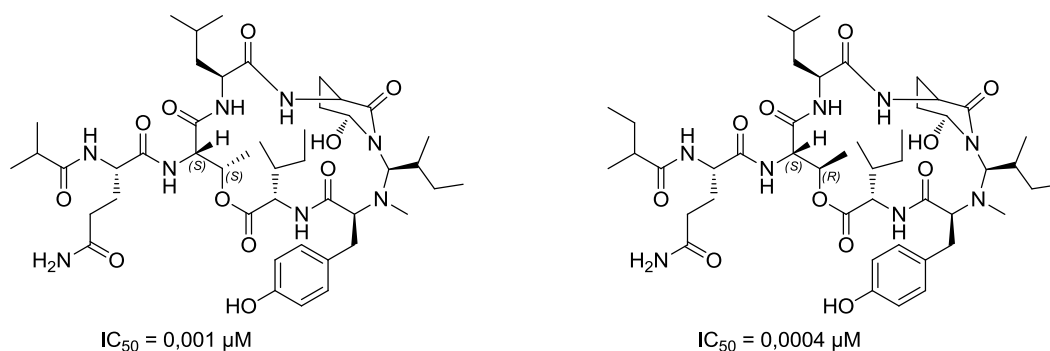


Figure I- 39 : Depsipeptides cycliques naturels, inhibiteurs de la KLK7

Des isocoumarines, extraites d'une plante brésilienne *Paepalanthus bromelioides* Silv., ont été récemment identifiées comme inhibiteurs compétitifs des kallicréines 5 et 7. Les meilleures affinités à l'égard des deux KLK ont été obtenues avec les composés de structure dimérique (la vioxanthine et la 8,8'-paépalantine) (Figure I- 40). La 8-8'-paépalantine est le meilleur inhibiteur de la KLK7 ($K_i = 12,2 \mu M$).¹⁶⁵

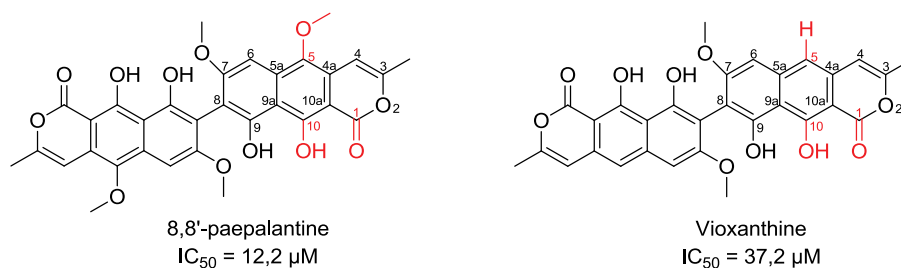


Figure I- 40 : Isocoumarines naturelles inhibant la KLK7

Les études de docking montrent que ces composés se positionnent dans les poches S1 et S1' de la KLK7. Le complexe enzyme-inhibiteur est stabilisé par des liaisons hydrogène. Le groupement carbonyle de la fonction lactone, présent sur la première moitié de la 8,8'-paépalantine, établit deux liaisons hydrogène avec les atomes d'azote des résidus Ser195 et Gly193, et occupe ainsi la région du trou de l'oxyanion. Des interactions supplémentaires se forment entre le groupement hydroxyle du sommet 10 et l'azote du résidu Gly193 du squelette protéique de l'enzyme. Une autre liaison hydrogène se forme entre le groupe carbonyle de l'histidine 57 et les groupes hydroxyles présents sur les sommets C9' et C10' de l'autre moitié du dimère.

L'absence de groupement méthoxyle sur le sommet 5 de la vioxanthine lui permet de se positionner beaucoup plus en profondeur dans la poche S1 que la 8,8'-paépalantine. Ceci explique que le groupe carbonyle en C1 de la vioxanthine n'occupe pas le trou de l'oxyanion, contrairement à la 8,8'-paépalantine. Cette différence de positionnement dans le site actif pourrait expliquer la plus grande affinité de la 8,8'-paépalantine pour la KLK7 comparée à la vioxanthine (12,2 μM au lieu de 37,2 μM).¹⁶⁵

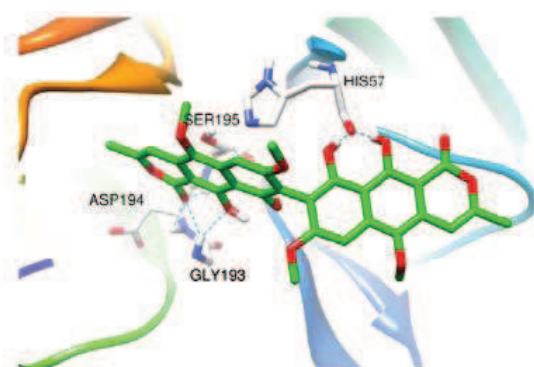


Figure I- 41 : Liaisons hydrogène entre le composé 8,8'-paepalantine et les résidus du site actif de la KLK7

IV.5.2. Inhibiteurs de type chlorométhyl-cétone

Des molécules de type chlorométhyl-cétones (TPCK, AAF-CMK, Suc-AAPF-CMK) ont été décrits comme des inhibiteurs irréversibles et non sélectifs de la KLK7. Par exemple, le composé *para*-tosyl-phenylalanine-chlorométhyl-cétone (TCPK) peut inhiber irréversiblement la KLK7 à des concentrations micromolaires.^{96, 57}

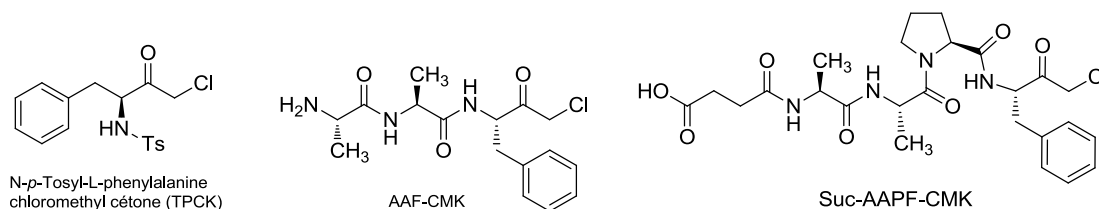


Figure I- 42 : Exemples de dérivés CMK inhibiteurs de KLK7

Des données cristallographiques ont été rapportées avec des inhibiteurs covalents de type chlorométhyl-cétone (AAF-CMK [code PDB : 2QXG], Suc-AAPF-CMK [code PDB : 2QXH]). La Figure I- 43 présente une structure cristallographique de la KLK7 avec l'inhibiteur Ala-Ala-Phe-chlorométhyl-cétone (à gauche) et l'inhibiteur Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-chlorométhyl-cétone (à droite).^{95, 96}

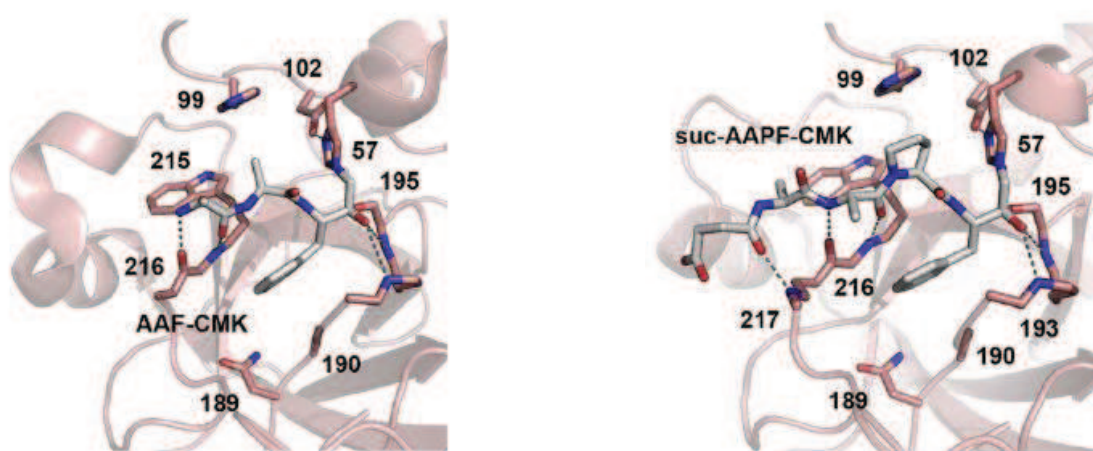


Figure I- 43 : Structure cristallographique de la KLK7 engageant des inhibiteurs covalents de type chlorométhyl-cétone. Les résidus clés de KLK7 sont présentés en rose et l'inhibiteur en gris clair. Les liaisons hydrogènes sont représentées en pointillés. A gauche : liaison covalente de Ala-Ala-Phe-CMK à l'azote N ϵ de His57. A droite : liaison covalente de Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-CMK à His57.

Le mécanisme d'inhibition est basé sur l'alkylation de l'azote N ϵ de l'histidine 57 (Figure I- 44). A la suite de l'attaque nucléophile de l'hydroxyle de la sérine 195, l'inhibiteur chlorométhyl-cétone se lie de façon covalente par le carbone de son groupe carbonyle, à la sérine

195 de la KLK7. Concomitamment, l'alcoolate de l'intermédiaire tétrahédrique occupe le trou de l'oxyanion, et forme des liaisons hydrogène avec les *NH* des résidus Ser195 et Gly193. La formation subséquente d'une liaison covalente entre le groupement méthylène de l'inhibiteur, et l'atome d'azote *N ϵ* de l'histidine 57, entraîne un blocage irréversible de l'enzyme.

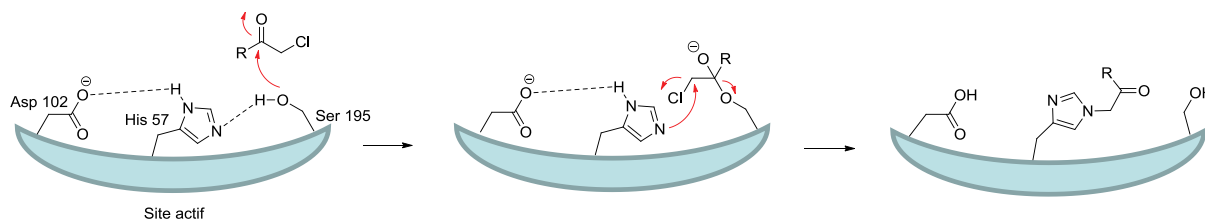


Figure I- 44 : Mécanisme d'inhibition par les chlorométhylcétones

L'inhibiteur est stabilisé par des interactions supplémentaires au sein du site catalytique de la KLK7. Dans le cas de deux inhibiteurs, le résidu P3 (Ala) établit des interactions dans la poche S3. En effet, le carbonyle et le NH du résidu Ala forment respectivement des liaisons hydrogène avec le NH et le carbonyle de la glycine 216. Les résidus P1 (Phe) et P2 (Ala) se localisent respectivement dans les poches S1 et S2. Dans le cas de l'inhibiteur Suc-AAPF-CMK, le résidu P4 (Ala) occupe la poche hydrophobe S4.

Il est à noter qu'actuellement, aucune structure cristalline avec des inhibiteurs non-covalents n'est disponible dans la *Protein Data Bank (PDB)*, ce qui rend la conception de composés réversibles plus délicate. Cependant, plusieurs inhibiteurs synthétiques ont été rapportés dans la littérature.

IV.5.3. Inhibiteurs de type « petites molécules »

X. Tan et *al.* ont décrit en 2013, des composés 1,2,4-triazole capables d'inhiber des KLK tissulaires. Le meilleur composé de cette famille de triazole, a montré une IC_{50} de 40 nM à l'égard de la KLK7 (Tableau I- 7, entrée 1). C'est un inhibiteur covalent réversible, mais non sélectif de la KLK7.¹⁶⁶

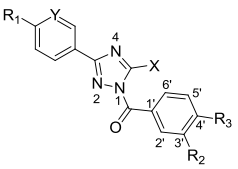
						IC ₅₀ (μM)		
Entrée	R ₁	Y	X	R ₂	R ₃	KLK5	KLK7	KLK14
1	H	N	NH ₂	H	CH ₃	0,27 ± 0,01	0,04 ± 0,001	1,97 ± 0,05
2	H	N	NH ₂	H	Cl	1,14 ± 0,08	0,22 ± 0,01	>30
3	H	C	NH ₂	OCH ₃	OCH ₃	1,30 ± 0,07	0,23 ± 0,01	>30
4	Cl	C	S-CH ₃	H	H	0,14 ± 0,01	0,66 ± 0,03	0,97 ± 0,03

Tableau I- 7 : Composés 1,2,4-triazoles, inhibiteurs de KLK tissulaires

Ces inhibiteurs se lient de manière covalente à l'enzyme. En effet, l'hydroxyle de la sérine catalytique est capable de rompre la liaison acyl-triazole, conduisant à l'acylation de la sérine catalytique de l'enzyme. Cette acylation est toutefois réversible. En effet, en présence d'un nucléophile tel que l'hydroxylamine, cette liaison ester entre la sérine et le résidu benzoyle peut être rompue, régénérant de ce fait l'enzyme native. Il a également été montré que la liaison ester pouvait être hydrolysée spontanément, ce qui permettait de réactiver totalement l'enzyme au bout de 6h. Ces composés agissent ainsi comme des inhibiteurs compétitifs réversibles à des concentrations inhibitrices micromolaires, ou nanomolaires.¹⁶⁶

En 2012, R. F. Freitas et *al.* ont identifié des composés de type isomannide capables d'inhiber la KLK5 et la KLK7 de manière compétitive (Figure I- 45). Deux des composés possèdent une plus grande affinité pour la KLK7 ($K_i \leq 3 \mu\text{M}$), comparée à la KLK5 ($K_i \approx 70 \mu\text{M}$).¹⁶⁷

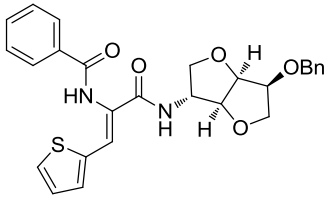
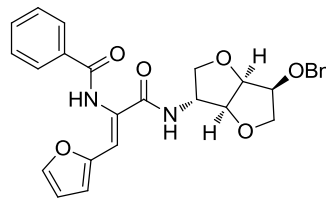
					
	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)		IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)
KLK7	13,3	1,8	KLK7	16,3	3,0
KLK5	99,2	70,7	KLK5	99,1	70,4

Figure I- 45 : Dérivés isomannides, inhibiteurs de KLKs

En 2014, le même groupe a rapporté que l'incorporation de résidus peptidomimétiques au motif isomannide, permettait d'augmenter l'activité inhibitrice vis-à-vis de la KLK5 et de la KLK7. Parmi les composés, certains présentent des affinités submicromolaires à l'égard de la

KLK5 ($K_i = 0,3$ à $0,7 \mu\text{M}$), et micromolaires à l'égard de la KLK7 ($K_i = 1,3$ à $2,8 \mu\text{M}$). Ces composés sont tous, des inhibiteurs compétitifs mais non sélectifs.¹⁶⁸

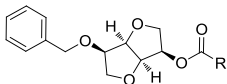
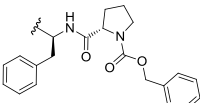
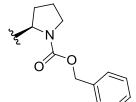
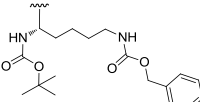
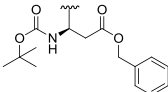
					
Entrée	R	KLK5		KLK7	
		IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)
1		3,9 ± 0,1	0,4 ± 0,05	19,6 ± 1,3	2,8 ± 0,9
2		3,7 ± 0,1	0,3 ± 0,02	16,6 ± 2,4	1,9 ± 0,6
3		9,0 ± 0,8	0,7 ± 0,06	13,7 ± 0,7	1,4 ± 0,1
4		4,7 ± 0,1	0,6 ± 0,07	10,2 ± 0,8	1,3 ± 0,2

Tableau I- 8 : Composés peptidomimétiques, inhibiteurs de KLK tissulaires

Des dérivés de type coumarine-3-carboxylate, possédant des propriétés inhibitrices à l'égard de certaines protéases dont les kallicréines KLK5, 7, 14 et la matriptase, ont été très récemment décrits. L'inhibition de KLK5, KLK14 et de la matriptase par ces composés est temporaire, tandis que la KLK7 est inhibée de manière irréversible. Certains composés sont sélectifs de la KLK7, avec des IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire (Tableau I- 9, entrées 4, 5 et 6).¹⁶⁹

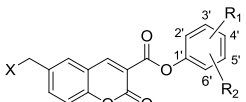
							
IC ₅₀ (μM) ou % Inhibition à 50 μM (ni : < 30% d'inhibition à 50 μM)							
Entrée	X	R ₁	R ₂	KLK5	KLK7	KLK14	Matriptase
1	Cl	2'-COOCH ₃	H	26,3 ± 1,4	2,7 ± 0,1	38 ± 5	33%
2	Cl	3'-CONH ₂	H	21,6 ± 5	7,8 ± 0,6	30 ± 8	10,5 ± 0,3
3	Cl	2'-Cl	5'-Cl	1,3 ± 0,1	0,19 ± 0,02	54,3 ± 6	ni
4	Cl	3'-Br	H	ni	0,065 ± 0,003	ni	ni
5	Cl	3'-I	H	ni	0,077 ± 0,003	ni	ni
6	Cl	3'-Cl	H	ni	0,103 ± 0,005	ni	ni
7	Br	3'-Cl	H	0,92 ± 0,07	0,064 ± 0,002	2,9 ± 0,1	1,42 ± 0,05
8	Br	3'-Br	H	1,47 ± 0,06	0,057 ± 0,002	3,0 ± 0,1	1,97 ± 0,05
9	Br	3'-F	H	42%	0,198 ± 0,008	48%	66%
10	Br	H	H	34%	0,249 ± 0,004	53%	62%

Tableau I- 9 : Exemples de dérivés coumarine-3-carboxylate, inhibiteurs de protéases

L'inhibition de la KLK7 par cette famille de composés se fait de manière irréversible. Ces composés sont caractérisés par la présence dans leur structure, de deux parties potentiellement réactives : une fonction lactone et un groupement chlorométhylène. Le cycle lactone peut être ouvert suite à l'attaque nucléophile de la serine 195 de l'enzyme, formant l'intermédiaire acyl-enzyme (Figure I- 46). La liaison ester entre l'inhibiteur et l'enzyme peut, à ce stade, être hydrolysée. Il s'agit ici d'une inhibition transitoire (voie b). Cependant, le dérivé phénolique obtenu par l'ouverture de la lactone peut conduire, après départ de l'atome de chlore, à un intermédiaire méthylène-quinone réactif (voie a). Ce dernier peut subir l'attaque d'un second centre nucléophile présent dans le site actif de l'enzyme. L'établissement subséquent d'une liaison covalente avec l'inhibiteur, conduit alors à une inhibition irréversible de l'enzyme. En principe, lorsque l'inactivation d'une enzyme résulte de la formation d'un complexe acyl-enzyme stable, ce dernier peut être désacétylé sous l'action d'un nucléophile tel que l'hydroxylamine pour régénérer l'enzyme. Les auteurs ont remarqué que dans le cas de la KLK7, l'ajout d'hydroxylamine ne permettait pas de lever l'inhibition. Cela peut s'expliquer par le fait que l'ouverture de la lactone qui résulte de l'attaque nucléophile de la serine 195, s'accompagne de la formation d'une liaison covalente comme illustré dans la Figure I- 46.¹⁶⁹

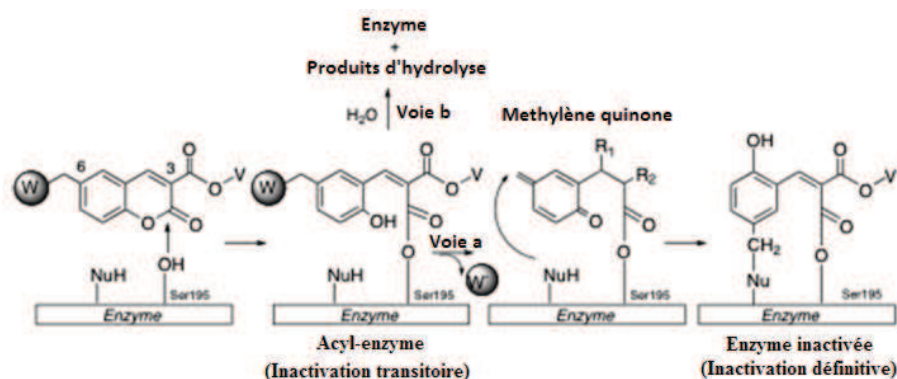


Figure I- 46 : Mécanismes proposés pour l'inhibition des KLK par les dérivés de type coumarine-3-carboxylate
Voie a : Inhibition irréversible. **Voie b :** Inhibition temporaire. **W :** bon groupe partant. **V :** groupe aryle.

Somme toute, le recours aux inhibiteurs synthétiques actuellement disponibles est limité par leur faible sélectivité, leur activité modérée, ou leurs propriétés physico-chimiques peu adaptées à une utilisation *in vivo*. Compte tenu des insuffisances constatées pour la plupart des inhibiteurs décrits précédemment, il y a un besoin urgent d'accéder à de nouveaux composés. Les stratégies disponibles sont assez limitées, reposant généralement sur des mimes de substrats peptidiques capables de cibler soit le site actif de l'enzyme, soit un site allostérique. Aujourd'hui,

le challenge est d'identifier et de développer des inhibiteurs qui soient non seulement puissants, mais surtout sélectifs de la KLK7. Idéalement, ces inhibiteurs devraient pouvoir se lier de façon réversible au site actif afin d'éviter des réactions immunitaires. A ce titre, nous avons décidé de développer des molécules de type hétérocyclique capables d'interagir, de manière réversible, avec l'enzyme au niveau du site actif. Il s'agit particulièrement de composés ayant un motif imidazo[1,2-*a*]pyridine. La synthèse et la réactivité de ce motif seront présentées dans la deuxième partie de ce manuscrit.

PARTIE II - ÉTAT DE L'ART SUR LE CYCLE IMIDAZO[1,2-*a*]PYRIDINE

Le terme « imidazopyridine » est utilisé pour désigner un système bicyclique aromatique possédant un azote en jonction de cycle. Ce bicycle résulte de la fusion d'un noyau pyridine et d'un noyau imidazole. Selon la position relative des azotes sur l'hétérocycle, on distingue deux isomères : l'imidazo[1,2-*a*]pyridine et l'imidazo[1,5-*a*]pyridine.

La Figure II- 1 illustre le mode de fusion des noyaux pyridine et imidazole pour l'obtention des isomères (Figure II- 1A et B). La numérotation du bicycle est précisée dans la Figure II- 1C. Les sites privilégiés de fonctionnalisation du noyau imidazopyridinique dépendent du régioisomère utilisé. Notre travail est basé sur le régioisomère imidazo[1,2-*a*]pyridine. Dans ce document, le sigle « *IP* » sera utilisé pour désigner le bicycle imidazo[1,2-*a*]pyridine.

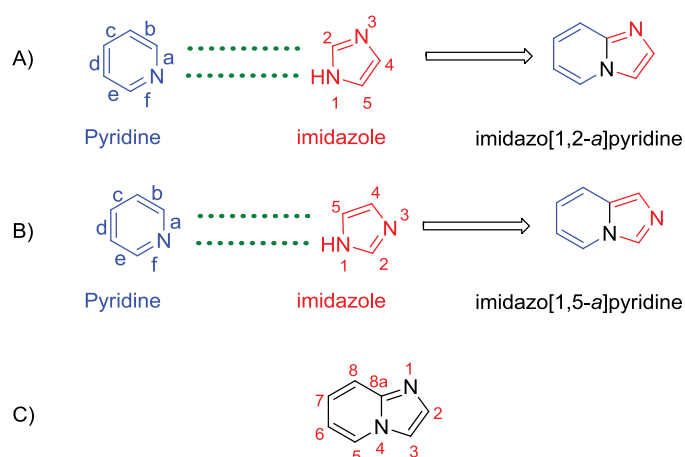


Figure II- 1 : Le cycle imidazopyridine

*A et B : Structures des isomères de l'imidazopyridine. C : numérotation de l'imidazo[1,2-*a*]pyridine.*

Dans cette partie du manuscrit, nous rappellerons tout d'abord l'intérêt du noyau IP en thérapeutique, en nous appuyant essentiellement sur quelques cibles enzymatiques. Nous présenterons ensuite les méthodes utilisées pour sa synthèse, avant de décrire sa réactivité.

I. INTÉRÊT DU NOYAU « IP » EN THÉRAPEUTIQUE

Les hétérocycles azotés sont communs dans les molécules pharmacologiquement importantes dont les activités couvrent une large gamme de cibles. A ce titre, le motif IP est largement utilisé dans la conception de molécules bioactives.

L'IP est une plateforme hétérocyclique hautement fonctionnalisable, aussi bien dans sa partie pyridinique que dans sa partie imidazolique. Compte tenu des différentes possibilités de fonctionnalisation, ce motif a fait l'objet de nombreux travaux. Des propriétés antivirales,^{170,171,172} antiulcéreuses,¹⁷³ antibactériennes,^{174,175,176, 177, 178} antifongiques,^{179,175} antiparasitaires,^{180,181,182} antiherpétiques,¹⁸³ anti-inflammatoires,^{184, 185, 186} anticancéreuses^{187,188,189} ont été rapportées pour des composés incorporant dans leur structure le noyau IP. De plus, il a été rapporté que les dérivés de l'IP possèdent une affinité pour les fibres beta-amyloïdes. Cette propriété a été exploitée pour développer des ligands radiomarqués dans le cadre du diagnostic et le traitement de la maladie d'Alzheimer.¹⁹⁰ Par ailleurs, K. Fuchs et *al.* ont rapporté la capacité de certains dérivés de l'IP à inhiber la formation des plaques β -amyloïdes, sans préciser clairement le mécanisme pharmacologique mis en jeu.¹⁹¹ Certains composés comportant ce système hétérocyclique ont été également décrits comme cardiotoniques. D'autres sont capables de se fixer sur le site des benzodiazépines et prolongent l'activité du récepteur GABA-A.^{192 193}

Il ne s'agit pas pour nous de donner ici, une description exhaustive des potentialités thérapeutiques des dérivés de l'IP. Nous nous limiterons à rappeler quelques molécules bioactives incorporant ce motif dans leur structure, parmi les plus significatives. Ensuite, nous décrirons l'utilisation du motif IP pour la conception d'inhibiteurs enzymatiques.

I.1. Molécules bioactives comportant un noyau IP

Les molécules ayant un noyau IP sont d'un grand intérêt en chimie médicinale du fait de leurs potentialités thérapeutiques précédemment évoquées. Le motif imidazo[1,2-*a*]pyridine est la structure de base de nombreuses molécules actives telles que le zolpidem, le nécopidem, le saripidem, l'olprinone, l'alpidem, la zolimidine, l'acide minodronique, la rifaximine, etc. (Figure II- 2).

Le zolpidem (STILNOX[®]) est l'une des premières molécules de type imidazo[1,2-*a*]pyridine mises sur le marché en 1990. C'est un médicament hypnotique utilisé dans le traitement de l'insomnie occasionnelle, transitoire ou chronique.¹⁹⁴ Ce composé agit sur le site de fixation des benzodiazépines au niveau des récepteurs GABA-A, prolongeant l'ouverture du canal aux ions chlorures.

L'alpidem (ANANXYL[®]) est un agent anxiolytique qui a été commercialisé en France en 1991. Il fut retiré du marché en 1995 compte tenu de sa toxicité hépatique.^{195, 196, 197} Cette

molécule, qui n'a été enregistrée nulle part ailleurs dans le monde,¹⁹⁸ agit selon le même mécanisme que le zolpidem.

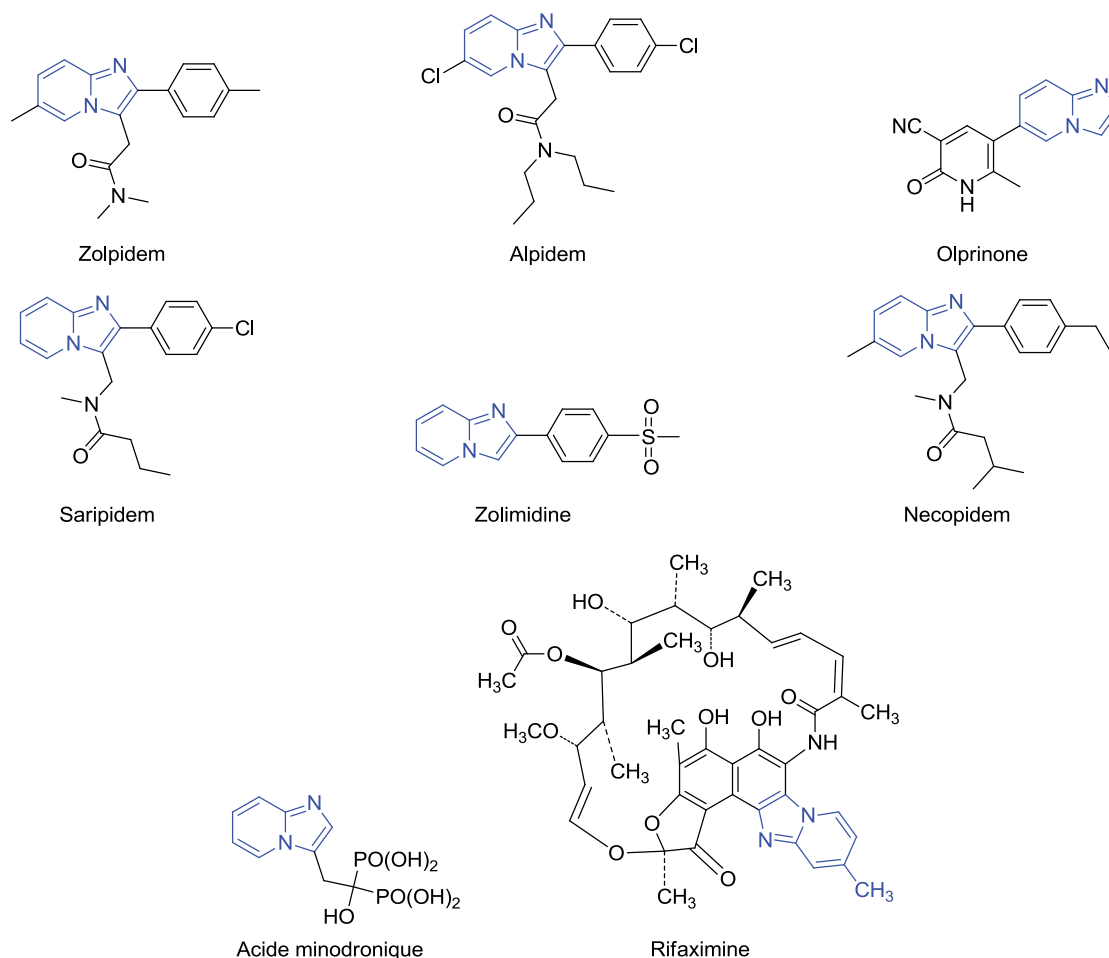


Figure II- 2 : Exemples de molécules bioactives incorporant un noyau IP

La zolimidine fut commercialisée pour ses effets dans les ulcères peptiques et les reflux gastro-oesophagiens mais ne fait plus l'objet d'utilisation en France.¹⁹⁹

L'olprinone (CORETEC[®]) est un inhibiteur de la phosphodiesterase III (PDE 3), prescrit pour le traitement à court terme des insuffisances cardiaques au Japon. Il entraîne une augmentation intracellulaire du taux d'AMP cyclique dans les cellules musculaires cardiaques et musculaires lisses des vaisseaux sanguins. L'olprinone possède ainsi un effet inotrope positif et vasodilatateur périphérique. Une action vasodilatatrice directe sur les artères cérébrales a également été mise en évidence pour cette molécule.^{200, 201}

La rifaximine (XIFAXAN[®], RIFAGUT[®]) est un antibiotique semi-synthétique dérivé de la rifamycine, très peu résorbé par voie orale. Elle est disponible dans plusieurs pays à travers le

monde, et est indiquée dans le traitement de la diarrhée infectieuse aiguë (diarrhée du voyageur) causée par *Escherichia coli*, et dans le traitement des encéphalopathies hépatiques.²⁰² Dans certains pays comme la France et la Belgique, ce produit est commercialisé sous le nom de FATROX[®] pour un usage vétérinaire. Il est notamment prescrit pour le traitement des mammites entraînant un tarissement chez les vaches.²⁰³ Ce composé agit selon le même mécanisme que la rifamycine. Il inhibe la synthèse des ARN bactériens, en se fixant à la sous-unité β de l'ARN polymérase bactérienne. Cependant, plusieurs études semblent indiquer que ce composé pourrait agir également par d'autres mécanismes.²⁰⁴

L'acide minodronique (BONOTE[®], RECALBON[®]) est un dérivé biphosphonate incorporant également le motif IP dans sa structure. Il est commercialisé au Japon pour le traitement de l'ostéoporose.²⁰⁵ Son mécanisme d'action est basé sur l'inhibition de la farnésyl-pyrophosphate synthase (EC 2.5.1.10), une enzyme clé de la biosynthèse des isoprénoïdes.²⁰⁶

Outre les composés précités, qui font l'objet d'une commercialisation, de nombreux travaux de recherche en chimie médicinale ont recours au motif IP pour concevoir des inhibiteurs enzymatiques.

I.2. Dérivés de l'IP comme inhibiteurs enzymatiques

L'inhibition enzymatique permet de réguler les voies métaboliques et participe ainsi à la coordination des mécanismes biologiques. Un inhibiteur enzymatique est une espèce capable de diminuer l'activité d'une enzyme. Il interagit généralement avec l'enzyme en formant un complexe enzyme-inhibiteur (E.I). Le dysfonctionnement de l'activité des enzymes est associé à une variété de pathologies, comme illustré dans la première partie de ce manuscrit.

Plusieurs équipes de recherches se sont intéressées à développer des molécules capables de moduler l'activité enzymatique. Certains travaux ont porté sur les dérivés imidazo[1,2-*a*]pyridines. On peut citer par exemple, des inhibiteurs de phosphoinositide-3-OH-kinases (PI(3)K), des kinases dépendantes des cyclines (CDK), des kinases glycogène synthases (GSK3), incorporant dans leur structure un motif IP.

I.2.1. Dérivés de l'IP comme inhibiteurs de protéines sérine/thréonine-Kinases

Les protéines sérine/thréonine kinases sont des enzymes qui catalysent la phosphorylation des résidus serine ou thréonine sur des protéines cibles en utilisant l'ATP comme donneur de

phosphate. Nous présentons dans ce chapitre, le rôle des dérivés IP dans l'inhibition de l'activité des PI(3)K, CDK et GSK3.

➤ Inhibition des PI(3)K

Les phosphoinositide-3-*OH*-kinases (PI(3)K) sont des protéines de signalisation intracellulaires qui interviennent dans la modulation d'une variété de fonctions cellulaires telles que la prolifération, la migration, l'apoptose. Des études récentes suggèrent qu'une dérégulation de leurs activités est associée à un nombre considérable de pathologies incluant le diabète, les thromboses, les arthrites rhumatoïdes, l'asthme et le cancer.^{207, 208}

En 2002, M. Hayakawa et *al.* ont breveté des dérivés imidazo[1,2-*a*]pyridiniques, inhibiteurs potentiels du sous-type p110 α de la PI(3)K. Le composé ci-après représenté a montré une activité supérieure (10 fois) à celle du LY294002, le premier inhibiteur synthétique de la PI(3)K, développé en 1994.^{209,210}

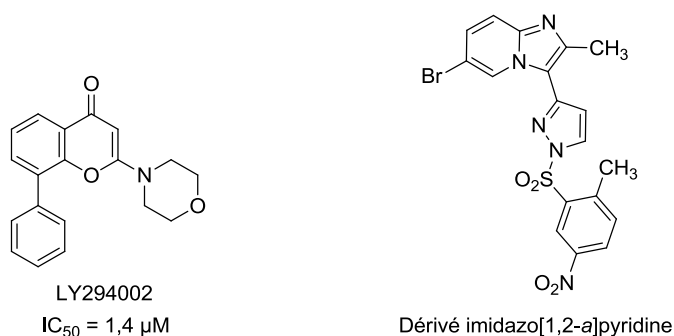
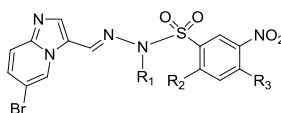


Figure II- 3 : Dérivé imidazo[1,2-*a*]pyridine, inhibiteur des PI(3)K

En 2010, O. Schmidt-Kittler et *al.* ont décrit des inhibiteurs de PI(3)K, de structure proche, qui empêchent la dissémination des métastases, et qui sont capables d'agir sur les sous-unités p110 α , β , γ et δ de l'enzyme.²¹¹




Entrée	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μ M)
1	Et	Me	H	0,015
2	Et	Me		0,011
3	Et	Me	NH ₂	0,002
4	Et	Cl	NH ₂	0,004

Tableau II- 1 : Inhibition de la sous-unité p110 α de PI(3)K par des dérivés imidazo[1,2-*a*]pyridines

➤ Inhibition des kinases cycline-dépendantes (CDK)

Les protéine-kinases dépendantes des cyclines (CDK) sont responsables du déclenchement et de la coordination des différentes phases du cycle de division cellulaire. Elles sont activées par association avec leurs sous-unités régulatrices appelées « cyclines ». Une surexpression des CDK a été démontrée dans les cellules tumorales notamment dans les cancers du sein, des poumons et du pancréas (CDK4), les cancers du foie et des ovaires (CDK2). Les travaux entrepris depuis quelques années ont conduit à l'identification de nombreuses familles d'inhibiteurs chimiques de CDK. Quelques molécules présentent des propriétés antimitotiques et agissent par inhibition compétitive de l'ATP en se localisant dans la poche de fixation de l'enzyme.²¹² C'est le cas d'une série de dérivés de l'IP développés par les laboratoires Astra-Zeneca, qui inhibent les enzymes CDK4 et CDK2 avec des IC_{50} submicromolaires.²¹³

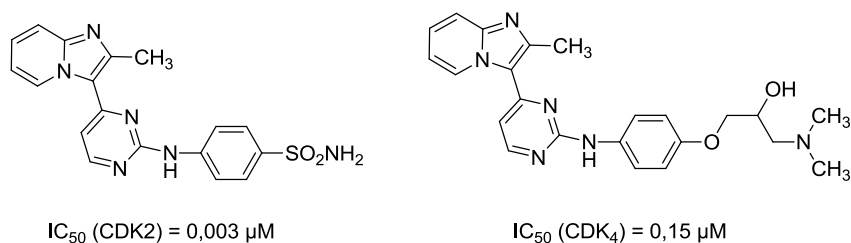


Figure II- 4 : Structures de composés imidazo[1,2-*a*]pyridines inhibiteurs de CDK

➤ Inhibition de la kinase glycogène synthase (GSK)

La protéine GSK est une serine/thréonine kinase impliquée dans le diabète de type 2, les maladies inflammatoires, la maladie d'Alzheimer et le cancer. La GSK phosphoryle la glycogène synthase (GS), enzyme qui catalyse la dernière étape de la synthèse du glycogène. Il y a une dizaine d'années, T. A. Engler et *al.* ont décrit une famille de dérivés IP, capables d'inhiber efficacement la GSK3- β avec des IC_{50} nanomolaires [$1,1 < IC_{50}$ (nM) $< 5,2$]. La structure du meilleur inhibiteur de cette famille d'IP est représentée dans la Figure II- 5.^{214,215}

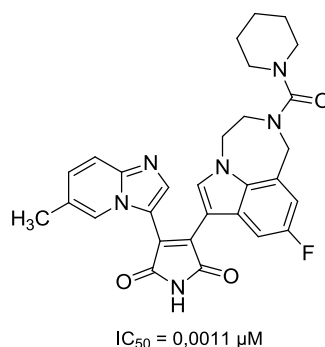


Figure II- 5 : Dérivé imidazo[1,2-*a*]pyridine, inhibiteur de la GSK3-β

I.2.2. Dérivés de l'IP comme inhibiteurs de fusion du Virus Respiratoire Syncytial (VRS)

Le virus respiratoire syncytial (VRS) est un virus à ARN responsable d'infections pulmonaires et des voies respiratoires telles que les pneumonies et les bronchiolites chez les jeunes enfants. Très récemment, S. Feng et *al.* ont décrit une série de dérivés IP comme de puissants inhibiteurs de fusion du virus respiratoire syncytial (VRS) humain.²¹⁶ Parmi les molécules développées, certaines ont montré une IC₅₀ supérieure à celle de l'inhibiteur BMS-433771, composé voisin de structure benzimidazole, initialement développé par le laboratoire pharmaceutique Bristol-Meyer-Squibbs (Figure II- 6).²¹⁷

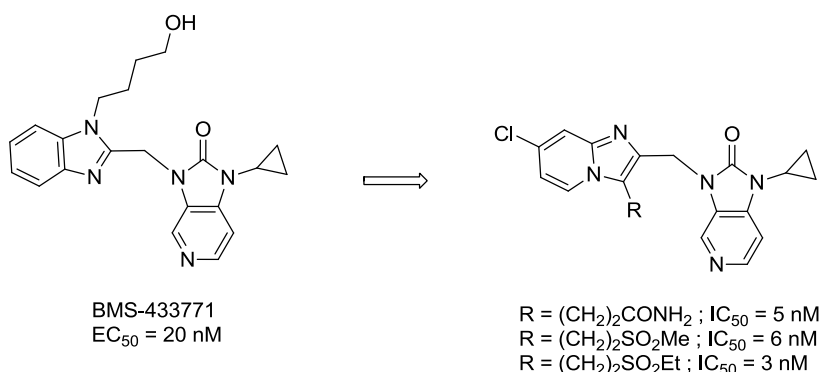


Figure II- 6 : Structure du BMS-433771, un inhibiteur de fusion du VRS et composés analogues en série IP

Compte tenu de ce qui précède, il apparaît évident que le noyau IP présente un intérêt non négligeable dans la conception de molécules bioactives. La présente étude met à profit les possibilités de fonctionnalisation qu'offre ce système hétérocyclique, pour développer des inhibiteurs enzymatiques. Cela implique nécessairement une connaissance des voies de synthèse et de la réactivité de ce noyau.

α -halogénocarbonyle. Cette approche permet l'utilisation d'un grand choix de réactifs commerciaux de départ, et s'effectue dans des conditions relativement douces.

II.1.1. Synthèse de dérivés imidazo[1,2-*a*]pyridiniques à partir des α -halogénocarbonyles

La synthèse du bicycle IP avec les dérivés α -halogénocarbonyles est régiosélective. L'alkylation se fait sur l'atome d'azote du cycle pyridinique. Dans certains cas, il est possible d'isoler le dérivé *N*-alkylé. Cet intermédiaire est ensuite cyclisé pour conduire au dérivé aromatisé, après déshydratation.²²⁰

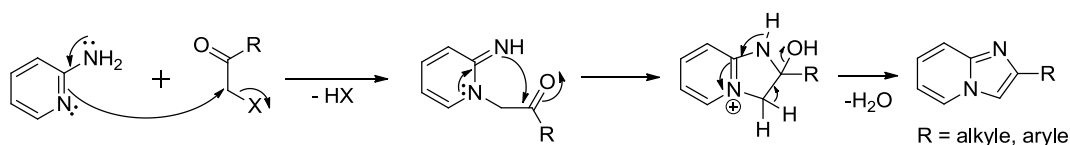


Schéma II- 1 : Schéma réactionnel général de synthèse du cycle IP à partir d' α -halogénocétone et de 2-aminopyridine

En utilisant des dérivés α -halogénocarbonyles convenablement substitués, il est possible d'accéder à des composés fonctionnalisés simultanément ou non, sur les sommets 2 et 3 du cycle IP (Schéma II- 1 à Schéma II- 5).

Par exemple, J. G. Lombardino a décrit en 1965, l'accès au cycle IP non substitué en position 2 et 3 en faisant réagir la 2-aminopyridine et le chloroacétaldéhyde en présence de bicarbonate de sodium.²²¹

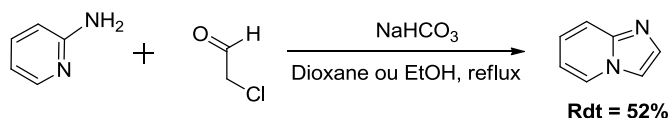


Schéma II- 2 : Synthèse du cycle IP avec le chloroacétaldéhyde

L'utilisation du bromopyruvate d'éthyle a également permis à cet auteur de synthétiser le bromhydrate d'imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylate d'éthyle, et de fonctionnaliser ainsi la position 2 du cycle IP par un groupement ester.²²¹

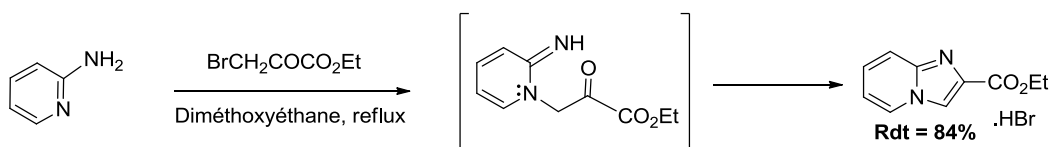


Schéma II- 3: Synthèse du cycle IP possédant une fonction ester en 2.

Cette méthode a également été utilisée pour accéder à des dérivés alkylés ou arylés en position 2 de l'IP (Schéma II- 4). Une série de composés 2-substitués a été ainsi préparée par J.-M. Chezal et *al.*, en faisant réagir une 2-aminopyridine substituée et une bromo- ou chlorohalogénocétone dans l'éthanol ou le butanol à reflux.²²² La réaction de cyclisation de Tschitschibabin permet aussi de préparer des dérivés disubstitués sur la partie imidazolique de l'hétérocycle (Schéma II- 5). C. Enguehard et *al.* ont utilisé cette méthode pour préparer un dérivé possédant à la fois une fonction ester en position 2, et un benzyle en position 3 de l'hétérocycle.²²³

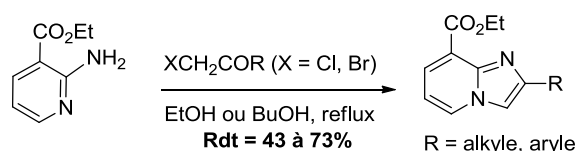


Schéma II- 4 : Exemple de synthèse de dérivés 2-substitués²²²

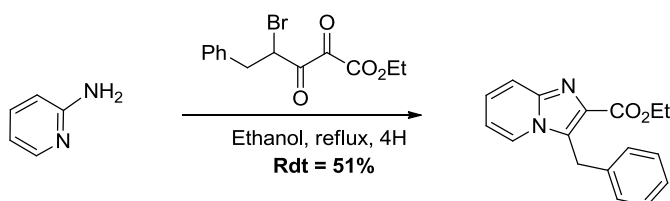


Schéma II- 5 : Exemple d'accès aux dérivés 2,3-disubstitués²²³

Basée sur le même principe, la réaction de la 2-aminopyridine avec des α -bromo- β -cétoesters permet d'accéder à des dérivés de l'IP possédant une fonction ester en position 3.

II.1.2. Synthèse de dérivés imidazo[1,2-*a*]pyridiniques à partir des α -bromo- β -cétoesters.

Récemment, K. C. Chunavala et *al.* ont décrit l'accès aux dérivés imidazo[1,2-*a*]pyridiniques en faisant réagir la 2-aminopyridine avec un α -bromo- β -cétoester. La réaction a lieu sans solvant et sans catalyseur sous irradiations micro-ondes. Elle est très rapide (< 2 min) et les produits sont obtenus avec des rendements allant de 91 à 94% (Schéma II- 6).²²⁴

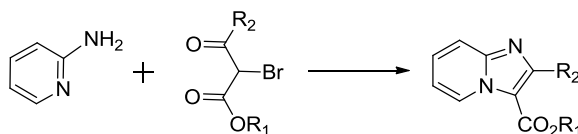


Schéma II- 6 : Synthèse de l'IP avec les α -bromo- β -cétoester

Le mécanisme proposé par les auteurs passe par une réaction initiale de l'amine exocyclique sur la cétone de l' α -bromo- β -cétoester pour former un premier intermédiaire. Ce dernier donne par déshydratation, un second intermédiaire plus stable. La dernière étape est une cyclisation intramoléculaire avec élimination d'une molécule d'acide bromhydrique (Schéma II- 7).

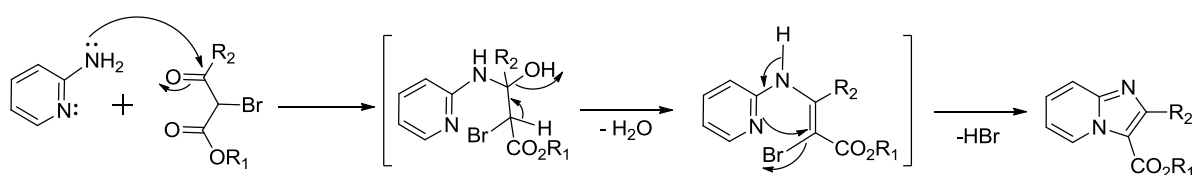


Schéma II- 7

Un autre mécanisme envisageable pour la formation de ce dérivé, est celui dont la première étape consisterait en une *N*-alkylation de l'azote pyridinique. Celle-ci s'accompagne d'une étape d'addition-élimination puis d'aromatisation du bicycle par déshydratation (Schéma II- 8).²²⁵

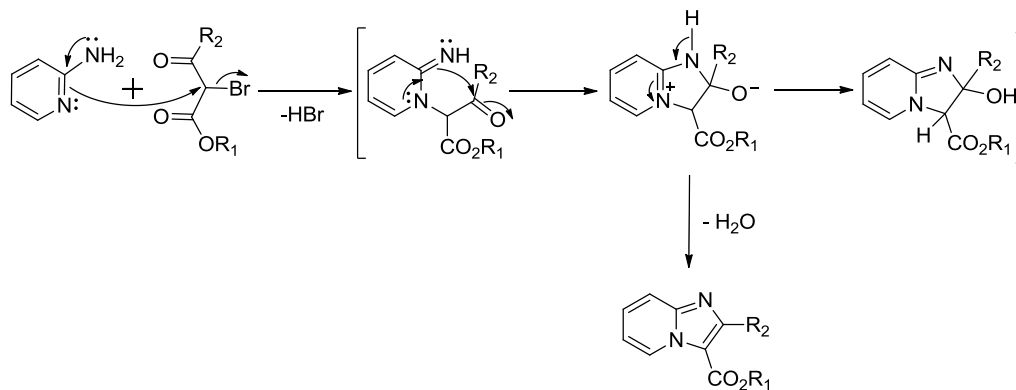


Schéma II- 8

Outre l'utilisation de dérivés α -halogénocétone, une alternative peut consister à utiliser des α -diazocétone pour accéder à des dérivés monosubstitués en position 2 de l'IP.

II.1.3. Synthèse de dérivés imidazo[1,2-*a*]pyridiniques à partir des α -diazocétone

La synthèse consiste à faire réagir un dérivé 2-aminopyridine avec une α -diazocétone en présence d'un catalyseur.²²⁶ Relativement stables, la plupart des composés α -diazocarbonylés se

décomposent sous certaines conditions (thermiques, photochimiques, catalysés avec les métaux de transition). Ils sont de ce fait très utilisés comme intermédiaires réactionnels en synthèse organique.²²⁷ La réaction procède *via* la formation initiale d'une imine, suivie de la formation de l'imidazo[1,2-*a*]pyridine avec départ de diazote. Cette approche a été largement développée en utilisant diverses α -diazocétone substituées pour donner les 2-aryle ou 2-alkylimidazo[1,2-*a*]pyridines correspondantes avec d'excellents rendements (environ 90%). Pour cette réaction, différents catalyseurs peuvent être utilisés. Les catalyseurs de choix sont l'acétate de rhodium ($\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$) et le triflate de cuivre $\text{Cu}(\text{OTf})_2$, ce dernier restant la meilleure alternative.

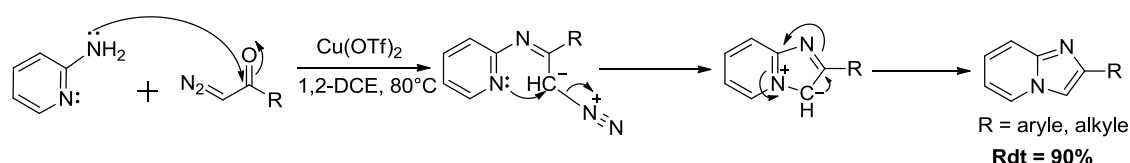


Schéma II- 9 : Synthèse de l'IP avec les α -diazocétones

Des réactions multi-composants qui nécessitent ou non l'utilisation d'un dérivé 2-aminopyridine, ont également été décrites pour accéder au cycle IP.

II.2. Réactions multi-composants (MCR)

Les réactions à composants multiples (MCR) sont des réactions convergentes, qui permettent de combiner en une seule opération au moins trois réactifs, pour aboutir à un produit incorporant de manière substantielle les composants de départ.



Figure II- 8 : Illustration d'une réaction à 4 composants (4-CR)

Le développement et l'application des réactions multi-composants font de nos jours, partie intégrante des activités de nombreuses unités de recherches en synthèse organique. Elles permettent d'accéder rapidement à des structures plus ou moins complexes à partir de matières premières très simples. De nombreuses publications ont permis d'étendre l'utilisation des MCR à la formation de structures complexes possédant plusieurs points de diversités. Certaines réactions font intervenir jusqu'à 8 réactifs.^{228, 229, 230}

Plusieurs variantes des réactions multicomposants ont été perfectionnées à partir notamment des travaux de Ugi et Passerini. La réaction de Passerini, décrite en 1921, met en jeu trois composants (un acide carboxylique, un composé carbonylé et un isonitrile) et permet d'aboutir à des dérivés α -acyloxy-carboxamides connus également sous le nom de depsipeptides (Schéma II- 10a).²³¹ La réaction de Ugi (dénommée aussi Ugi-4CR ou U-4CR), découverte en 1959, est une réaction à quatre composants qui met en jeu une amine, un aldéhyde, un acide carboxylique, et un isonitrile pour donner un α -acétamidoamide (Schéma II- 10b).^{232, 233}

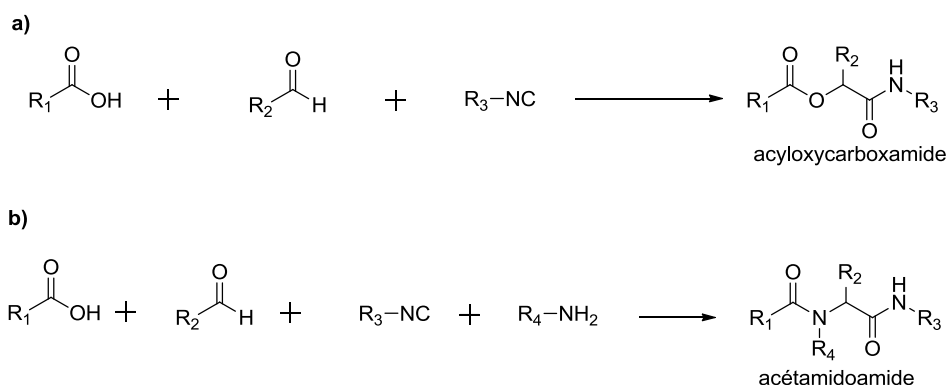


Schéma II- 10 : Réactions multi-composants modèles : a) réaction de Passerini ; b) réaction de Ugi

La formation du noyau imidazo[1,2-*a*]pyridine n'est pas restée en marge de l'intérêt accordé aux MCR. Les principales MCR développées dans ce cadre sont des réactions entre la 2-aminopyridine, un aldéhyde et un troisième composant qui peut être un nitroalcène, un triméthylsilane, un isonitrile, un alcyne ou un acide alcyne carboxylique, etc. (Cf. Figure II- 7).

En 1998, K. Groebke, C. Blackburn et H. Bienaymé ont exploité indépendamment les MCR, pour accéder aux composés imidazo[1,2-*a*]hétérocycliques. En effet, en se basant sur les travaux de Ugi, ils ont démontré qu'en faisant réagir un dérivé 2-aminopyridine avec un aldéhyde en présence d'isonitrile, il était possible de former le squelette IP. Le quatrième composant de la réaction Ugi-4CR, l'acide en l'occurrence, est utilisé ici comme catalyseur. Par exemple, K. Groebke a utilisé l'acide acétique pour catalyser la réaction (Schéma II- 11a) tandis que Blackburn a fait intervenir un acide de Lewis, le trifluorométhanesulfonate de scandium ($\text{Sc}(\text{OTf})_3$). H. Bienaymé et *al.* ont utilisé un puissant acide de Brønsted, l'acide perchlorique (Schéma II- 11b).^{234, 235, 236, 237}

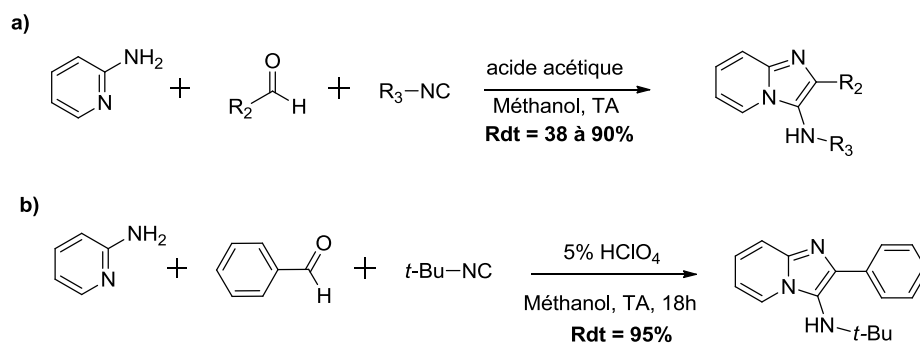


Schéma II- 11

D'un point de vue mécanistique, l'obtention du bicyclic passe par la formation d'un iminium intermédiaire lequel subit une cycloaddition avec l'isonitrile. Une étape d'aromatisation subséquente permet d'avoir le bicyclic IP.

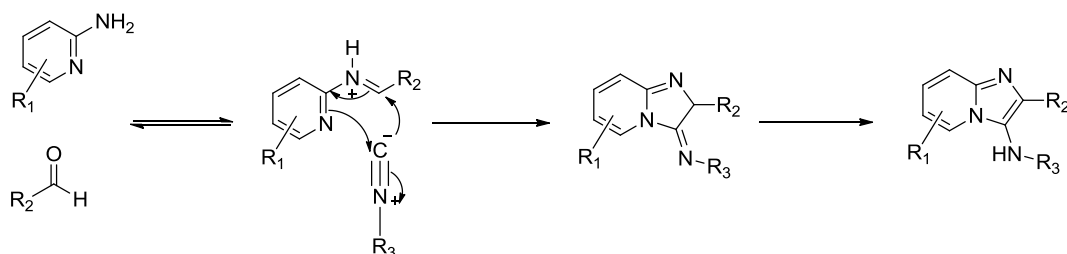


Schéma II- 12 : Mécanisme de l'hétérocyclisation (K. Groebke)

De la même façon, les motifs imidazo[1,2-*a*]pyrazine, -pyrimidine et -thiazole peuvent être formés en utilisant l'amine hétéroaromatique convenable. Cependant, les trois chercheurs ont noté que des produits secondaires difficilement séparables sont observés au cours de ces réactions avec pour conséquence une baisse des rendements.

Il faut noter que lors de ces réactions, deux isomères peuvent être formés selon que l'iminium est généré par action de l'aldéhyde sur l'amine exocyclique ou sur l'azote endocyclique (Schéma II-13).

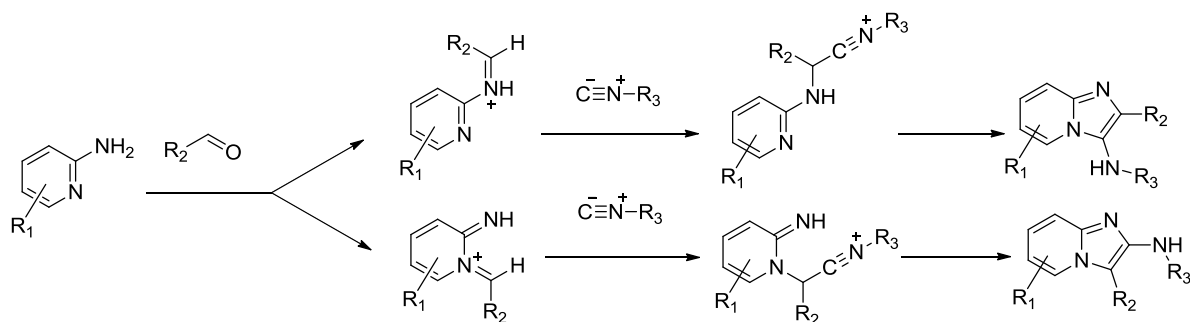


Schéma II- 13 : Isomères possibles lors de la réaction de Groebke

Des protocoles permettant l'obtention unique du dérivé 3-amino-substitué ont été décrits. Il s'agit notamment de réaliser ces réactions en présence de liquides ioniques comme le bromure de 1-butyl-3-méthylimidazolium ([bmim]Br), ou dans des solvants non polaires comme le toluène^{238, 239,240,241}

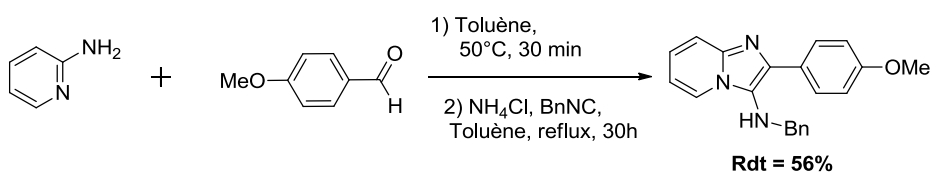


Schéma II- 14

En 2011, B.V. Subba Reddy *et al.* ont décrit une synthèse « one-pot » d'imidazo[1,2-*a*]pyridines *via* une réaction à trois composants, catalysée par le bromure d'indium (III) (InBr₃). Dans cette approche, l'isonitrile utilisé dans la réaction de Ugi, est remplacé par un alcyne vrai.²⁴²

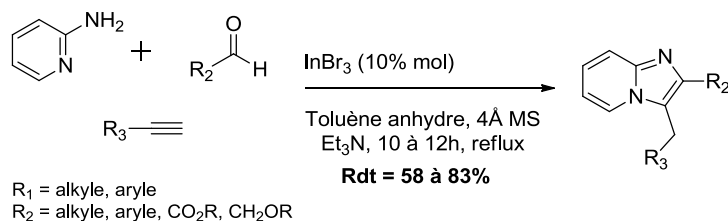


Schéma II- 15

Le rôle du bromure d'indium (III) est d'activer le composant alcyne et le dérivé imine issu de la condensation de l'aldéhyde avec la 2-aminopyridine. Le tribromure d'indium est aujourd'hui considéré comme un acide de Lewis « vert » en synthèse organique, car contrairement aux acides de Lewis conventionnels, il a l'avantage d'être simple d'utilisation, recyclable et stable dans l'eau. Il tolère les composés contenant de l'oxygène et de l'azote ainsi que de nombreux groupes fonctionnels. En outre, il agit comme un catalyseur à caractère π -acide de Lewis, ce qui lui permet

d'activer les insaturations carbonées et notamment les alcynes vis-à-vis d'attaques nucléophiles. Le mécanisme proposé par B.V. Subba Reddy *et al.* est présenté dans le Schéma II- 16.

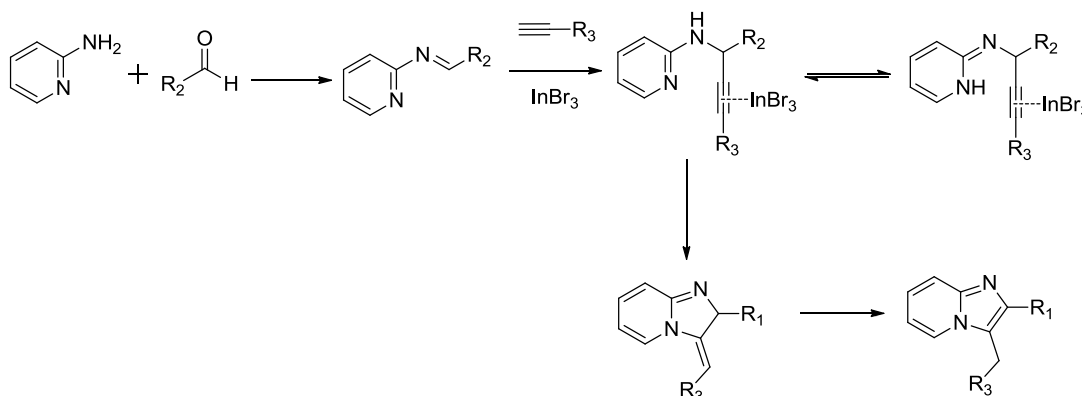


Schéma II- 16 : Mécanisme proposé pour la formation du cycle IP

Très récemment, M. Tajbakhsh *et al.* ont décrit cette même MCR en utilisant des espèces catalytiques à base de complexe de cuivre, en milieu aqueux (Schéma II- 17). Le catalyseur de choix est un complexe constitué de nanoparticules d'oxyde ferrique qui ont été fonctionnalisées par un complexe biimidazole-cuivre I [MNP@BiimCu]. Ce catalyseur peut être recyclé et réutilisé au moins dix fois sans perdre son pouvoir catalytique.²⁴³ Cette méthode permet de former le cycle IP dans des conditions douces avec de bons rendements (65 à 95%) et des temps de réactions relativement courts.

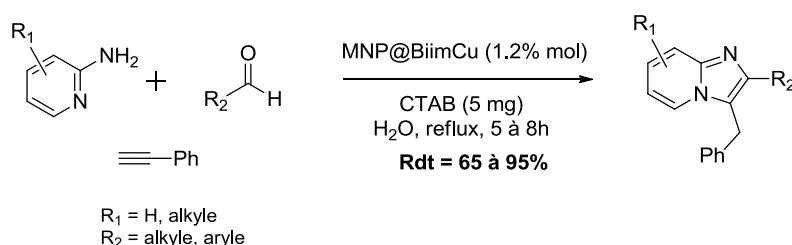


Schéma II- 17 : Synthèse d'IP en présence de nano-catalyseur recyclable
MNP@BiimCu : nanoparticules magnétiques supportées par des complexes biimidazole-cuivre I.
CTAB : bromure de cétyltriméthyle ammonium utilisé comme surfactant.

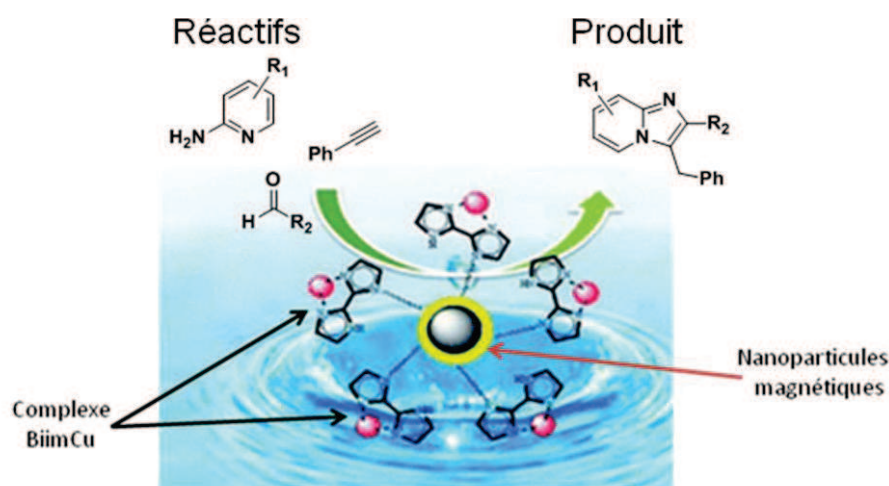


Figure II- 9 : Synthèse d'IP *via* une approche MCR catalysée par des nanoparticules magnétiques²⁴³

Dans l'ensemble, l'approche par réaction multi-composants permet une fonctionnalisation simultanée des positions 2 et 3 du cycle IP. La simplicité d'opération, la réduction de la durée de la réaction, la formation de peu de sous-produits voire l'absence de sous-produits sont d'autres avantages des approches MCR.

Une troisième classe de réactions permettant d'accéder au motif IP regroupe des réactions catalysées par des métaux.

II.3. Réactions catalysées par des métaux

Outre les travaux de B.V. Subba Reddy et *al.*, et de M. Tajbakhsh et *al.* précédemment évoqués, des réactions, ne faisant intervenir que 2 réactifs, et catalysées par des métaux ont été rapportées dans la littérature. Par exemple, l'accès à des dérivés IP monosubstitués en position 2 en utilisant un catalyseur à base d'or a été décrit récemment.

II.3.1. Synthèse de dérivés imidazo[1,2-*a*]pyridiniques à partir de pyridines *N*-oxydes et d'alcynes

Très récemment, E. P.A. Talbot et *al.* ont décrit une nouvelle approche d'accès au bicyclic IP substitué en position 2, à partir de pyridines *N*-oxydes et d'alcynes, en présence de catalyseurs à base d'or et d'acide de Brønsted (Schéma II- 18a).

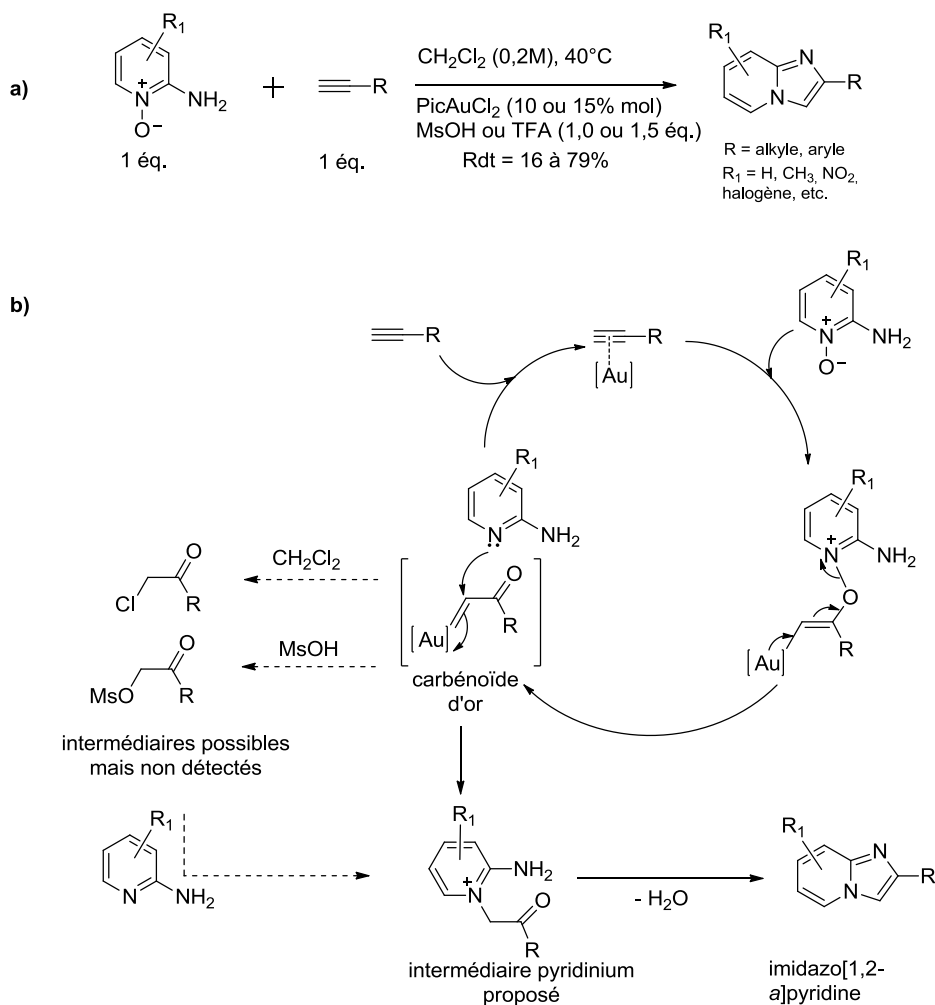


Schéma II- 18 : Synthèse de l'imidazo[1,2-a]pyridine à l'aide de catalyseur à base d'or
a) Schéma réactionnel (*Pic* = 2-pyridinecarboxylate) ; b) Mécanisme proposé pour la formation du cycle.

La formation du cycle IP passe par la génération préalable d'un carbénoïde d'or intermédiaire et de la 2-aminopyridine. Cette dernière peut alors réagir avec le carbénoïde pour conduire à un sel de pyridinium. Celui-ci donne ensuite le dérivé imidazopyridinique après cyclisation. Il est à noter que le pyridinium intermédiaire peut également provenir de la réaction entre la 2-aminopyridine et des composés α -chlorocétone ou α -mésylcétone, potentiellement générés par la réaction entre le carbénoïde d'or et le dichlorométhane ou l'acide méthanesulfonique respectivement. Cependant, les auteurs rapportent que ces composés α -chlorocétone ou α -mésylcétone n'ont pas été détectés au cours de la réaction. Ceci semble indiquer que le carbénoïde généré *in-situ* réagit directement avec la 2-aminopyridine pour former le cycle IP (Schéma II-18b).²⁴⁴ Récemment, les nitrooléfines ont émergé comme des partenaires réactionnels intéressants

des dérivés 2-aminopyridines pour la synthèse d'IP. Plusieurs types de catalyseurs métalliques ont été rapportés dans cette catégorie de réactions, conduisant à des produits variés.

II.3.2. Synthèse de dérivés imidazo[1,2-*a*]pyridiniques à l'aide de nitrooléfines

Une procédure « *one-pot* » de synthèse d'imidazo[1,2-*a*]pyridines à partir d'aminopyridines et de nitrooléfines a été développée en 2012. C'est une réaction catalysée par le bromure de cuivre I (CuBr) qui utilise l'air comme agent oxydant.²⁴⁵ Cette stratégie conduit à des dérivés 3-nitro-imidazo[1,2-*a*]pyridines.

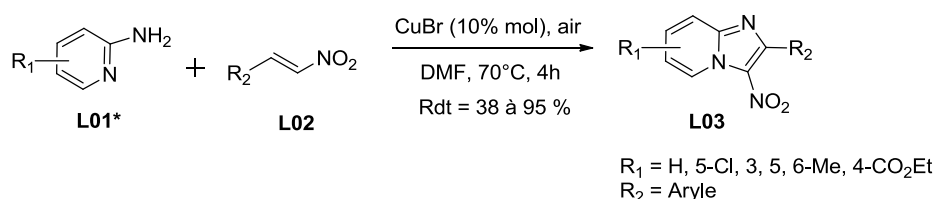


Schéma II- 19 : Synthèse de dérivés 3-nitro-IP

Le mécanisme plausible de la réaction est détaillé dans le Schéma II- 20. La première étape est un couplage entre l'aminopyridine **L01** et le nitoalcène **L02** selon une addition de type Michael pour donner l'intermédiaire **L04**. La seconde étape est l'oxydation du composé **L04** avec le cuivre pour générer le cation radical **L05**. Les sels de cuivre (I) ou (II) peuvent être utilisés pour cette réaction. L'intermédiaire **L05** subit une abstraction d'un radical hydrogène pour former l'ion nitrenium **L06**, qui après déprotonation conduit à l'imine **L07** avec établissement d'un équilibre en faveur de l'énamine **L08**. A partir du composé **L08**, les étapes d'oxydation par le cuivre et d'abstraction d'un radical hydrogène se reproduisent pour donner successivement les intermédiaires **L09** et **L10**. Le dérivé cyclique **L11**, formé *via* une addition nucléophile intramoléculaire de l'intermédiaire **L10**, subit une déprotonation pour donner finalement le composé **L03**.

*Les structures de quelques réactions rapportées dans cette partie du manuscrit, sont identifiées par un code composé de la lettre **L** suivie d'un numéro de série de 2 chiffres.

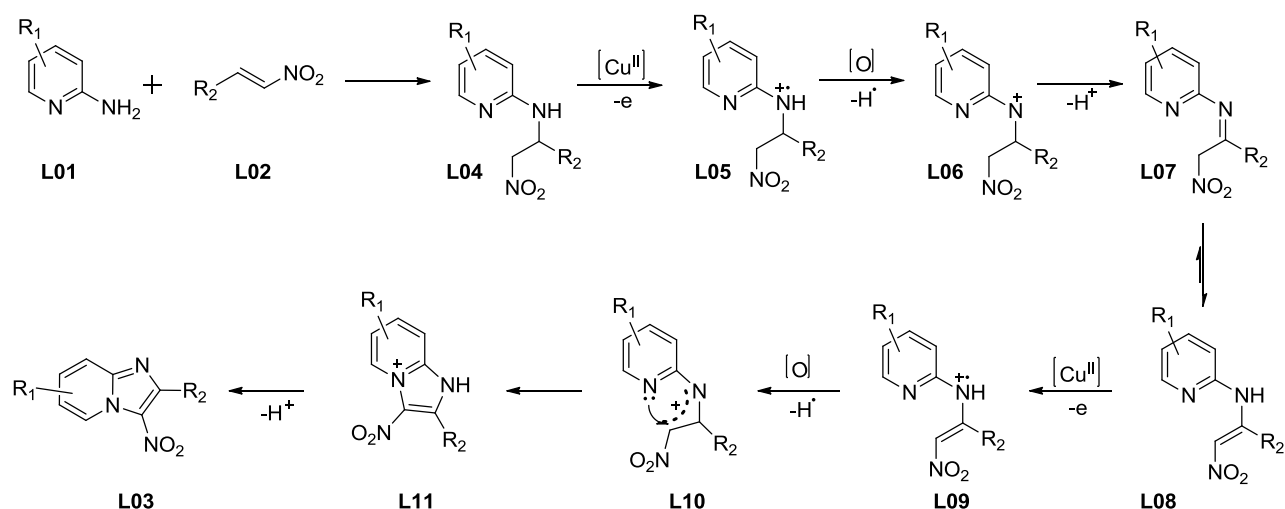


Schéma II- 20

L'utilisation d'une grande variété de dérivés nitrooléfines substituées est tolérée dans cette approche. Les dérivés nitrés riches en électrons sont beaucoup plus réactifs et offrent de meilleurs rendements que les composés électro-déficitaires. Il est à noter qu'en absence de catalyseur, les produits désirés ne sont pas formés.²⁴⁵

S. Santra et *al.* ont décrit une approche de synthèse dans laquelle des sels de fer tels que Fe(OTf)₃, FeBr₃ et FeCl₃ sont utilisés comme catalyseurs, le catalyseur de choix étant le FeCl₃. Dans cette procédure, le produit est formé *via* une cyclisation intramoléculaire accompagnée d'une dénitration *in situ*, conduisant ainsi à un dérivé IP non substitué en 3. En absence de catalyseur, la formation du produit désiré n'est pas observée.²⁴⁶

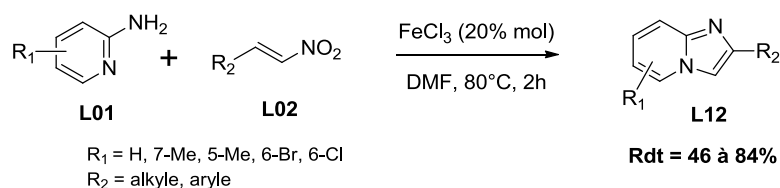


Schéma II- 21

S. Santra et *al.* ont proposé un mécanisme réactionnel qui est détaillé dans le Schéma II- 22. La réaction entre l'azote exocyclique de la 2-aminopyridine **L01** et la nitrooléfine **L02**, selon une addition de Michael, donne l'intermédiaire **L13**. Le trichlorure de Fe(III) semble augmenter l'électrophilie de la nitrooléfine par sa coordination au groupe nitro, accélérant ainsi la réaction. L'étape suivante est une cyclisation intramoléculaire de l'intermédiaire **L13**. L'intermédiaire **L014**

qui en résulte conduit finalement au composé **L12** après l'élimination d'une molécule d'eau et d'un nitroxyde (HNO).

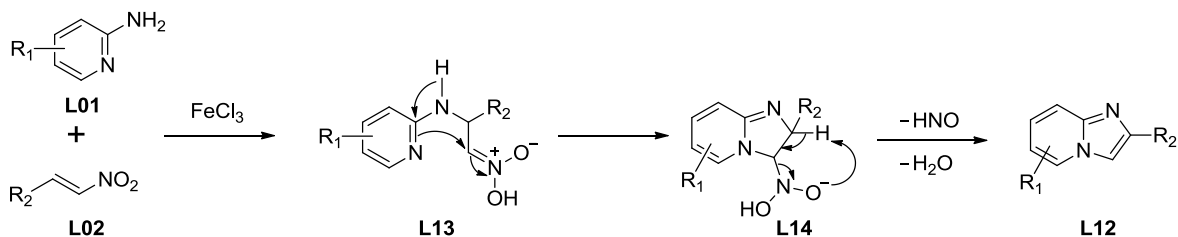


Schéma II- 22 : Mécanisme réactionnel

En 2014, M. Kamarul et *al.* ont remarqué que l'utilisation du 1,2-dichloroéthane et de nitrate ferrique nonahydraté comme catalyseur modifie la réactivité de la 2-aminopyridine avec le nitroalcène. Les produits isolés sont alors des dérivés 2-nitro-imidazo[1,2-*a*]pyridines, contrairement aux méthodes précédentes. Toutefois, cette stratégie est limitée aux composés nitroalcènes aromatiques.²⁴⁷

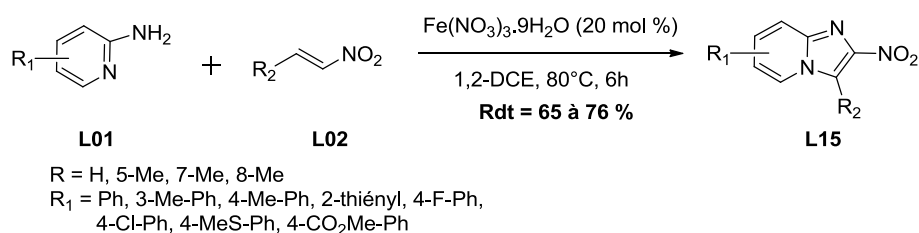


Schéma II- 23 : Synthèse de dérivés 2-nitro-IP

Le mécanisme de la formation des composés désirés est représenté dans le Schéma II- 24. La première étape est la réaction entre le dérivé aminopyridine **L01**, et le nitroalcène **L02** au niveau de l'azote endocyclique pour donner le produit d'addition de Michael **L16**. Le solvant utilisé lors de la réaction, en l'occurrence le 1,2-dichloroéthane, semble agir comme oxydant pour compléter le cycle catalytique de la réaction. Les auteurs rapportent que la réaction entre les composés **L01** et **L02**, en l'absence de catalyseur, conduit uniquement au composé d'addition **L16**. Par ailleurs, seul le nitrate de fer semble capable de catalyser la réaction de cyclisation du produit d'addition de Michael en dérivé IP. Il se produit une oxydation du composé **L16** par le fer, selon un mécanisme de transfert d'un seul électron (*SET*). Ceci est suivi d'une étape d'abstraction d'hydrogène et de déprotonation pour former l'intermédiaire **L19**. L'oxydation subséquente du composé **L19** par le fer, suivie d'une cyclisation intramoléculaire donne l'intermédiaire **L21** lequel, après déprotonation, conduit au produit désiré **L15**.

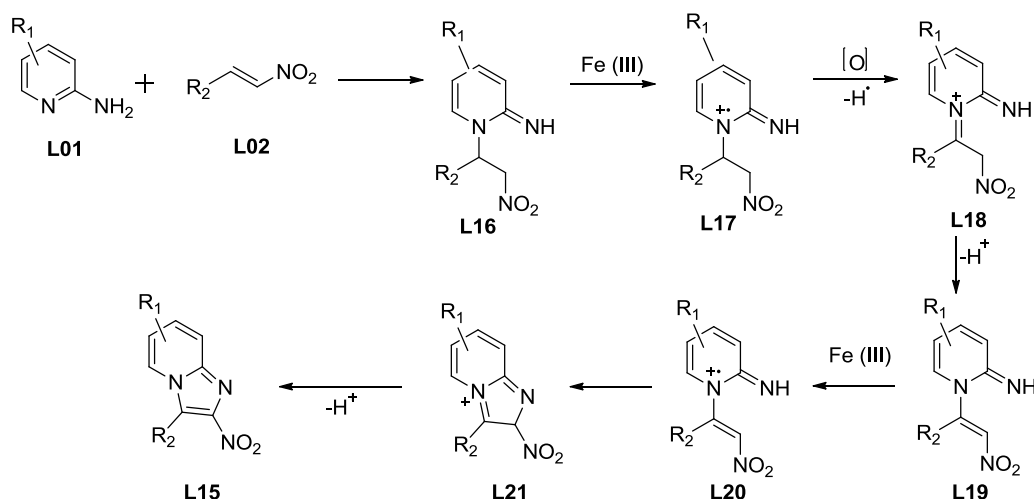


Schéma II- 24

Ces dérivés nitroimidazo[1,2-*a*]pyridines sont d'un intérêt certain, puisqu'ils peuvent être convertis par simple réduction en leurs composés aminoimidazo[1,2-*a*]pyridines correspondants. Il est à noter que des dérivés 2-amino-IP peuvent également être préparés sans passer par un intermédiaire nitré.

II.4. Synthèse des dérivés 2-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridiniques

Deux méthodes pour accéder aux dérivés 2-amino-IP, synthons de base pour notre travail, ont été rapportées dans la littérature. La première consiste en une réaction de cyclisation de 2-(1,2-dihydro-2-iminopyridin-1-yl)acétamides. La seconde méthode utilise comme étape-clé, un réarrangement de Curtius.

II.4.1. Synthèse de dérivés imidazo[1,2-*a*]pyridiniques à partir de 2-(1,2-dihydro-2-iminopyridin-1-yl)acétamides.

Cette approche, initialement décrite en 1981 par R. J. Bochis et *al.*, puis adaptée par C. Hamdouchi et *al.*, consiste en une *N*-tosylation de l'amine exocyclique du dérivé 2-aminopyridine **L22** pour former le dérivé sulfonamide correspondant **L23**. L'intermédiaire **L23** subit une *N*-alkylation de l'azote pyridinique avec un composé 2-halogénoacétamide dans le DMF en présence d'une base de Hünig (diisopropyléthylamine ou DIPEA). Le composé 2-(2-iminopyridin-1-yl)acétamide **L24** résultant est cyclisé en présence d'anhydride trifluoroacétique (TFAA) dans le dichlorométhane à température ambiante, pour conduire au composé trifluoroacétamide **L25**, précurseur du dérivé 2-amino-IP (Schéma II-25).^{248, 249, 250}

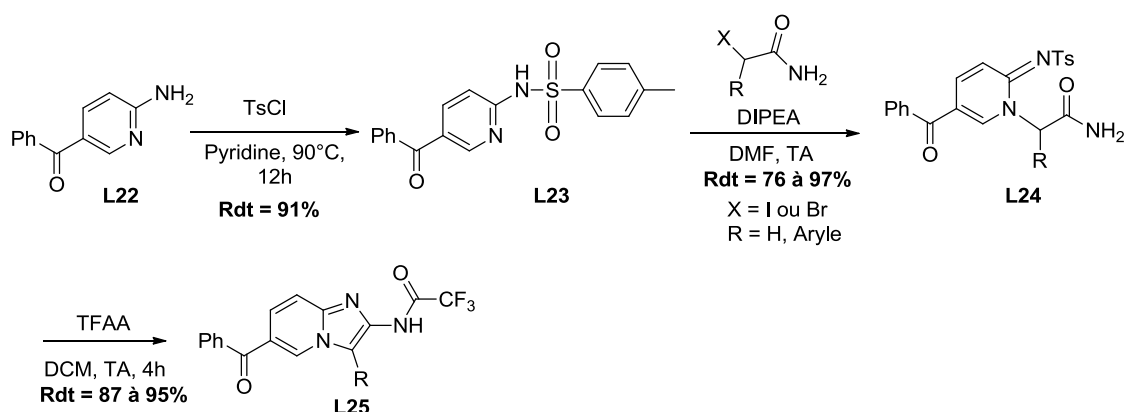


Schéma II- 25

Une seconde approche pour accéder aux dérivés 2-amino-IP a été décrite par J.-M. Chezal et *al.* en 2002.²⁵¹

II.4.2. Synthèse de dérivés 2-amino-IP par réarrangement de Curtius

Cette synthèse permet un accès régiosélectif au dérivé 2-amino-IP *via* un réarrangement de Curtius. La première étape est la formation d'un dérivé (imidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl)carboxylate **L26** à partir de la 2-aminopyridine. Le dérivé ester **L26** est ensuite converti en dérivé carbohydrazide **L27** dont le traitement par l'azoture et le nitrite de sodium en présence d'acide chlorhydrique, donne le carbazide intermédiaire **L28**. Ce dernier est porté à reflux dans l'éthanol pour donner le carbamate **L29** par réarrangement de Curtius. Enfin, la saponification du carbamate **L29** conduit au composé 2-amino-IP **L30**.

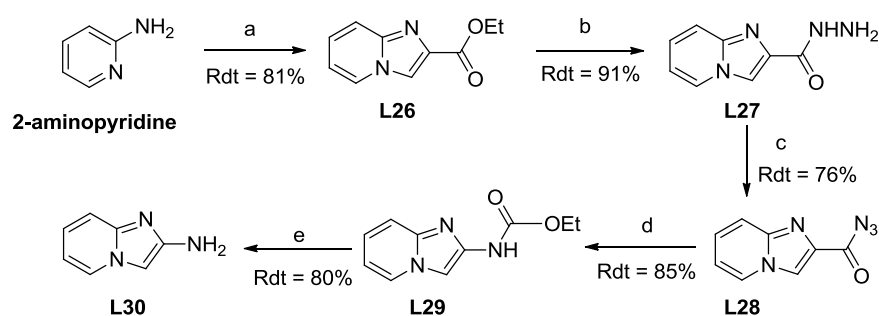


Schéma II- 26 : Réactifs et conditions : a) NaHCO₃, EtOH, chloroacétaldéhyde, Δ, 9h ; b) NH₂NH₂, EtOH, Δ, 60 h ; c) NaNO₂/HCl, NaN₃, 4h; d) EtOH, Δ, 3,5h ; e) NaOH (5N), Δ, 7h.

Pour résumer ce chapitre, nous pouvons noter que la 2-aminopyridine est le produit de départ communément utilisé pour la synthèse du synthon IP. Cela peut s'expliquer par sa

disponibilité commerciale. En outre, son caractère binucléophile permet une addition nucléophile initiale soit sur l'amine exocyclique soit sur l'azote endocyclique ; ce qui offre la possibilité de contrôler la régiosélectivité et d'orienter la fonctionnalisation de l'IP vers le sommet 2 ou 3.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que contrairement à la plupart des approches qui conduisent à une fonctionnalisation simultanée des positions 2 et 3, la stratégie décrite par C. Hamdouchi et *al.* permet d'accéder sélectivement à des dérivés 2-amino-IP.

Notre étude a pour but de synthétiser des composés de type pyrido[1,2-*a*]imidazo[1,3]-diazépines à partir du synthon 2-amino-IP. Le chapitre suivant décrit la réactivité du cycle IP afin d'aider à la compréhension de son comportement au cours des réactions.

III. Réactivité du cycle imidazo[1,2-*a*]pyridine

La présence de 10 électrons π délocalisés confère au noyau imidazo[1,2-*a*]pyridine un caractère aromatique. Les structures de résonance les plus importantes de l'IP sont les formes **Ia** et **Ib**²⁵² (Schéma II- 27). Le cycle imidazole est π -excédentaire et le cycle pyridine, π -déficientaire.

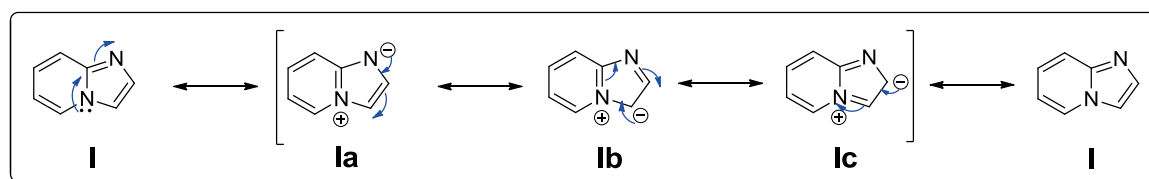


Schéma II- 27 : Formes mésomères de l'imidazo[1,2-*a*]pyridine

Le bicyclic IP possède théoriquement quatre sites de substitution électrophile (S_E) : les positions 2, 3, 6 et 8. Les travaux de Paolini et Robins sur les réactions de substitution de l'imidazo[1,2-*a*]pyridine ont montré qu'en pratique, les sites d'attaque électrophile privilégiés sont les positions 2 et 3.²⁵³ Les positions 6 et 8 ont une très faible réactivité vis-à-vis des substitutions électrophiles. Les positions 5 et 7 permettent théoriquement des substitutions nucléophiles (S_N) (Figure II- 10).

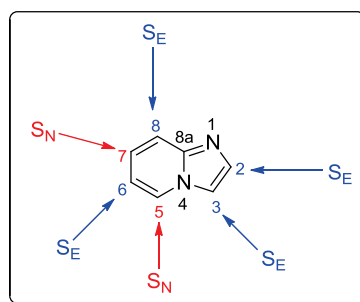


Figure II- 10 : Sites de substitutions électrophile et nucléophile de l'imidazo[1,2-*a*]pyridine

III.1. Réactions de substitution nucléophile

Les réactions de substitution nucléophile sont théoriquement possibles sur les positions 5 et 7 du cycle IP, mais très peu d'exemples sont rapportés dans la littérature. Les quelques rares réactions de substitution nucléophile décrites, nécessitent une fonctionnalisation préalable du cycle IP. Elles ont lieu alors en position 5 ou 2 du cycle.

III.1.1.Substitution nucléophile en position 5

L'attaque nucléophile de la position 5 de l'IP peut être réalisée par l'ion hydroxyde. Ceci conduit à une ouverture du cycle pyridinique, formant un dérivé carbonylé intermédiaire (Schéma II- 28, dérivé **L34**). Ce dernier peut alors se cycliser pour reformer le cycle IP, selon le mécanisme ci-dessous.

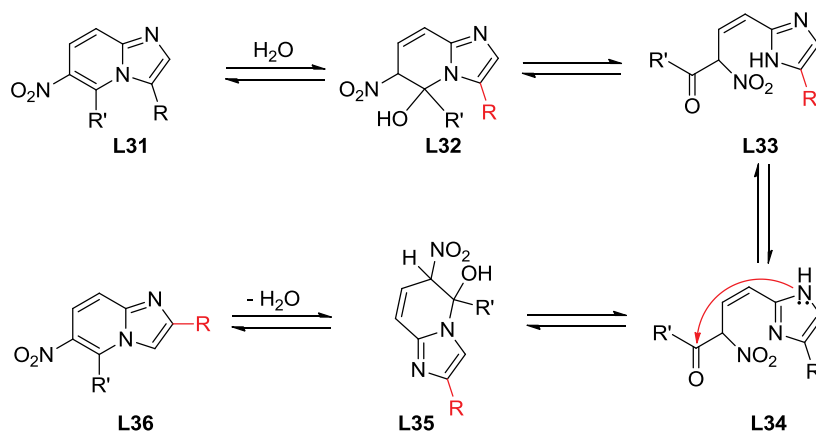


Schéma II- 28

Lors de la cyclisation, on peut assister à une inversion des positions des substituants éventuellement présents sur les positions 2 et 3 du cycle. Cette réaction est appelée réarrangement de Dimroth, et consiste en une translocation d'un hétéroatome endocyclique ou exocyclique

suivant une séquence d'ouverture et de fermeture de cycle. Ce processus est favorisé en milieu acide ou basique, en présence de chaleur ou de lumière.^{254, 255} Dans le cas de l'imidazo-[1,2-*a*]pyridine, le réarrangement de Dimroth est favorisé lorsque le cycle est substitué en position 3 par un groupe électro-attracteur. Par exemple, la 3-méthyl-IP ne subit pas de réarrangement même après 24h à 90°C dans une solution aqueuse de soude à 5%.²⁵⁵ De plus, la présence d'un groupe électro-attracteur en position 6 ou 8 est requise pour cette isomérisation.²⁵⁶ Le réarrangement conduit alors à des isomères d'IP substitués en position 2 (Schéma II- 29, composés **L36** et **L38**). Le déplacement de l'équilibre vers cet isomère est nettement favorisé lorsque le substituant présent en position 2 de l'isomère parent est un groupe nitro ou halogéno plutôt qu'un groupe méthyle.²⁵⁶

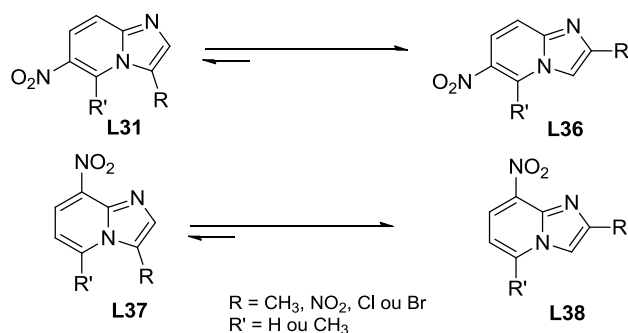


Schéma II- 29

Une autre réaction de substitution nucléophile a été décrite en série IP. Il s'agit d'une attaque de la position 2 d'un dérivé 3-nitro-IP.

III.1.2.Amination en position 2

Lorsque le cycle IP est substitué en position 3 par un groupe électro-attracteur tel qu'un groupement nitro, une amination de la position 2 de l'hétérocycle est alors possible. Cette amination s'effectue avec l'hydroxylamine selon un mécanisme de substitution nucléophile aromatique par procuration communément appelée « réaction VNS » (*VNS* : *vicarious nucleophilic substitution*). Dans l'exemple suivant, l'amination en position 2 est favorisée par le caractère électro-attracteur du groupement nitro en C-3.²⁵⁷

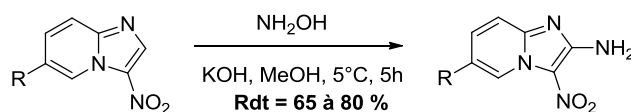


Schéma II- 30

La réaction a lieu en présence d'une base forte telle que l'hydroxyde de potassium. La substitution de l'hydrogène en position 2 de l'IP est rendue possible grâce à l'élimination du groupement hydroxyle sous forme d'une molécule d'eau, selon le mécanisme détaillé dans le Schéma II- 31.²⁵⁸

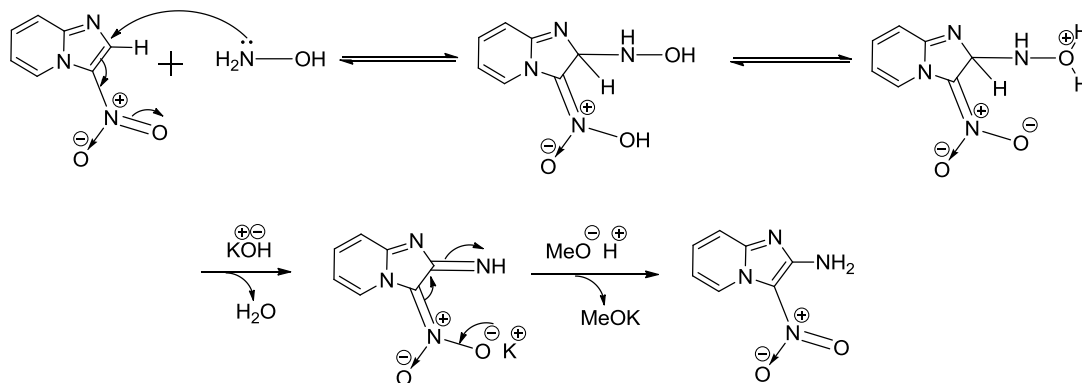


Schéma II- 31

Les réactions de substitution électrophile sont les réactions les plus courantes sur le noyau IP et une grande variété d'électrophiles a été utilisée pour fonctionnaliser cet hétérocycle.

III.2. Réactions de substitution électrophile

Les substitutions électrophiles de l'IP ont été décrites pour la première fois par J. P. Paolini et R. K. Robins en 1965. La position 3, riche en électrons, est celle qui favorise le plus l'attaque électrophile.^{252,259,260} Diverses substitutions électrophiles aromatiques (SE_{Ar}) comme l'introduction d'un groupement NO_2 , d'un halogène sont ainsi possibles directement en position 3. Par ailleurs, cette position peut également être déprotonée en utilisant des bases fortes, telles les bases lithiées. Ceci permet alors d'exacerber le caractère nucléophile de la position 3 et d'élargir les possibilités de fonctionnalisation de cette position.

III.2.1.Nitration du noyau IP

La nitration de l'IP permet d'introduire un groupement nitro qui peut ensuite être réduit pour donner les dérivés amines correspondants. L'acide nitrique concentré en présence d'une quantité catalytique d'acide sulfurique ou le nitrite de sodium dans l'acide acétique peuvent être utilisés comme réactifs.^{261, 235} Les composés nitrés sont le plus souvent isolés avec de très bons rendements.

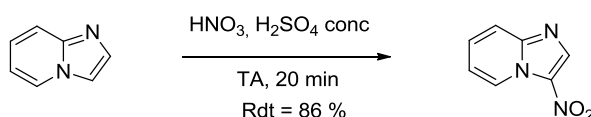


Schéma II- 32

Une autre réaction de substitution électrophile en position 3 est la réaction d'halogénéation. Les dérivés halogénés pourront être ensuite utilisés comme substrat pour diverses réactions de couplage pallado- ou cupro-catalysées.

III.2.2.Halogénéation

L'halogénéation de l'IP peut être réalisée en utilisant des réactifs tels que le *N*-bromosuccinimide (NBS), le *N*-chlorosuccinimide (NCS) ou le *N*-iodosuccinimide (NIS) lesquels permettent d'introduire respectivement un atome de brome, de chlore et d'iode. Paudler et Blewitt ont démontré en 1965 qu'il était possible d'effectuer la bromation du noyau IP en position 3 et d'obtenir sélectivement le dérivé mono-bromé.²⁵⁹

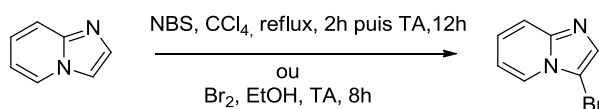
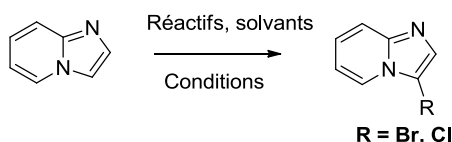


Schéma II- 33

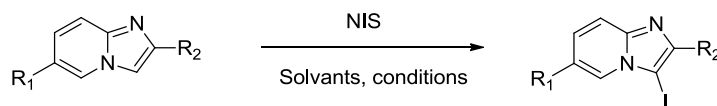
Le traitement de l'IP avec le *N*-bromoacétamide dans le chloroforme ou avec le dibrome dans une solution aqueuse de soude permet aussi l'obtention du composé 3-bromo-imidazo[1,2-*a*]pyridine.



R	Réactifs	Solvants	Conditions	Rdt (%)
Cl	NCS	CHCl ₃	TA, 1h	43
Br	<i>N</i> -bromoacétamide	CHCl ₃	Reflux, 10 min	63
Br	Br ₂ , NaOH	H ₂ O	TA, 5 min	80

Schéma II- 34 et Tableau II- 2

Les premiers essais d'iodation de l'IP ont été effectués en utilisant le diiode dans l'éthanol ou la pyridine^{262, 263} Les travaux réalisés par la suite dans ce domaine, donnent des exemples d'iodation sur l'IP avec le NIS dans le chloroforme, l'acétonitrile ou le méthanol.^{264, 265}



R ₁	R ₂	Solvants	T (°C), Durée	Rdt (%)
		Acétonitrile	0°C, 10 min	98
		Acétonitrile	TA, 1 nuit	69
H	CO ₂ Et	Acétonitrile	TA, 1 nuit	88

Schéma II- 35 et Tableau II- 3

Si la position 3 est déjà bloquée (présence d'un méthyle par exemple), les substitutions électrophiles ont lieu en position 5 contrairement à la prédiction des calculs de densité électronique faite pour l'imidazo[1,2-*a*]pyridine parente. Ainsi, lorsque la 3-méthylimidazo[1,2-*a*]pyridine est traitée avec le *N*-bromosuccinimide, on obtient la 5-bromo-3-méthylimidazo[1,2-*a*]pyridine avec un rendement de 80%.²⁵³

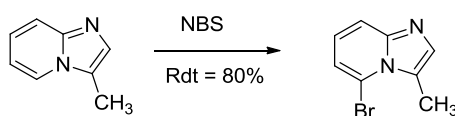


Schéma II- 36

Les dérivés halogénoimidazo[1,2-*a*]pyridines sont des intermédiaires particulièrement importants, et peuvent servir de synthons pour des réactions catalysées par des métaux tels que le palladium ou le cuivre. Par exemple, les couplages de type Suzuki, Sonogashira et Stille ont été décrits sur des imidazo[1,2-*a*]pyridines possédant un atome d'halogène.

➤ Couplage de Suzuki

Le couplage de Suzuki consiste à faire réagir un composé halogéné ou triflate et un dérivé du bore en présence de catalyseurs au palladium (0). Ces derniers peuvent être commerciaux

(Pd(PPh₃)₄) ou générés *in situ* à partir d'un sel de palladium (II), tels que PdCl₂ ou Pd(OAc)₂, lequel est facilement réduit en complexe Pd(0) actif.

Un exemple de ce type de réaction avec les halogénoIP, est la synthèse développée par C. Enguehard et *al.* pour accéder à des dérivés 3-(hétéro)arylimidazo[1,2-*a*]pyridines à partir de 3-iodoimidazo[1,2-*a*]pyridines.²²³

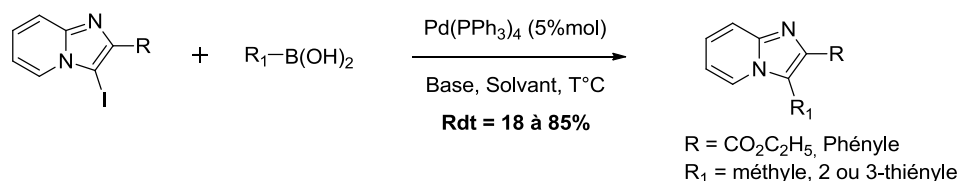
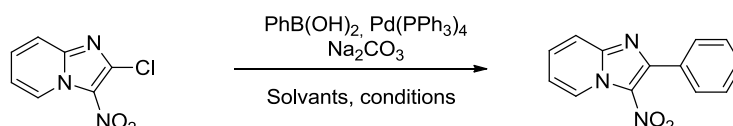


Schéma II- 37 : Exemple d'obtention de noyau IP par couplage de Suzuki

Base : Na₂CO₃, NaOH, Ba(OH)₂

Solvant = Toluène, THF, DME

Récemment, S. Marhadour et *al.* ont décrit la synthèse de la 3-nitro-2-phénylimidazo[1,2-*a*]pyridine à partir de la 2-chloro-3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine en utilisant la réaction de Suzuki.²⁶⁶



Entrée	Solvants	Conditions	Rdt (%)
1	Dioxane/ H ₂ O	Reflux, 16 h	74
2	DME/H ₂ O	Reflux, 16 h	90
3	DME/H ₂ O	microondes, tube scellé, 75°C, 100 W, 3h	70

Schéma II- 38 et Tableau II- 4

Une autre réaction pallado-catalysée possible avec les halogénoIP est le couplage de Sonogashira.

➤ Couplage de Sonogashira

Le couplage de type Sonogashira consiste à faire réagir un dérivé halogéné avec un alcyne terminal, appelé alcyne vrai. La réaction est catalysée par un complexe de palladium (0) en présence de sel de cuivre (I) comme co-catalyseur et d'un excès de base.

Ce type de couplage a été utilisé pour introduire des groupements alcynyles aux positions 6 ou 8 de l'IP.²⁶⁷

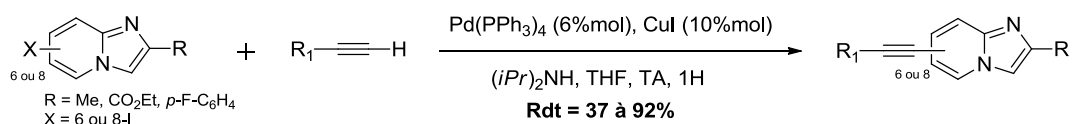


Schéma II- 39

Alors que la fonctionnalisation des positions 6 et 8 a été obtenue aisément, l'introduction de groupements alcynyles en position 3 de l'IP semble plus difficile, le résultat de la réaction étant largement conditionné par la nature du groupement présent en position 2 de l'IP. En particulier, la présence d'une fonction ester peut entraîner une chute de rendement, probablement due à la complexation du cuivre par le dérivé IP. Cependant, l'optimisation des conditions réactionnelles (nature du complexe de palladium et du solvant utilisés) permet généralement d'accéder aux dérivés C-3 fonctionnalisés portant divers groupements en position 2, y compris une fonction ester (Tableau II- 5).

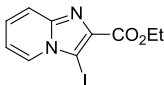
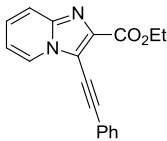
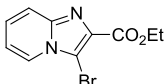
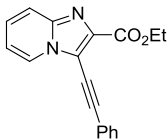
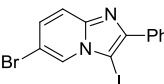
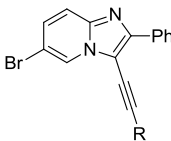
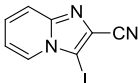
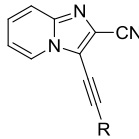
Substrat	Système catalytique	Base	Solvant	Produits	Références
	Pd ₂ (dba) ₃ / CuI	NEt ₃	THF	 Rdt = 64%	267
	PdCl ₂ (MeCN) ₂ / CuI	NEt ₃	CH ₃ CN	 Rdt = 90%	268
	Pd(PPh ₃) / CuI	NEt ₃	DMF	 R = OMe, CH ₂ OMe, C(Me) ₂ OH, CH ₂ OH, Ph, etc. Rdt = 88 à 96%	269
	Pd(dba) ₃ , CuI	NEt ₃	1,4-dioxane	 R = Ph, nC ₅ H ₁₁ , cyC ₃ H ₅ , tert-C ₄ H ₉ Rdt = 55 à 83%	270

Tableau II- 5

La présence des alcynyles sur l'IP peut être mise à profit pour accéder à une variété de composés. Par exemple, Zineb et *al.* ont exploité le couplage de Songashira pour réaliser une synthèse régiosélective de dérivés pyrano[3',4':4,5]imidazo[1,2-*a*]pyridin-1-one diversement substitués à partir de l'acide 3-iodoimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylique. Même si le rendement de la réaction reste modeste, cette nouvelle approche offre l'avantage de ne nécessiter que du sel de cuivre (I) contrairement au couplage de Sonogashira classique.²⁶⁵

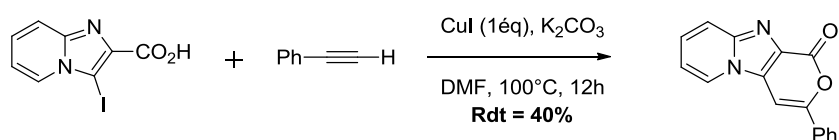


Schéma II- 40

Les réactions de couplage de Stille ont également été décrites en série IP. Par exemple, ils ont permis d'introduire des groupements alcényles en position trois, six et huit de l'IP.

➤ Couplage de Stille

Le couplage de Stille consiste en une réaction entre un dérivé halogéno-aryle et un composé organostannique en présence d'une quantité catalytique de palladium. En 2007, A. Gueiffier et *al.* ont réalisé ce type de couplage, en utilisant des dérivés halogéno-IP.¹⁷⁰ Il est à noter que le recours aux dérivés d'étain, qui donnent des résidus toxiques et difficiles à éliminer, limite l'utilisation de ce type de couplage dans l'industrie pharmaceutique.

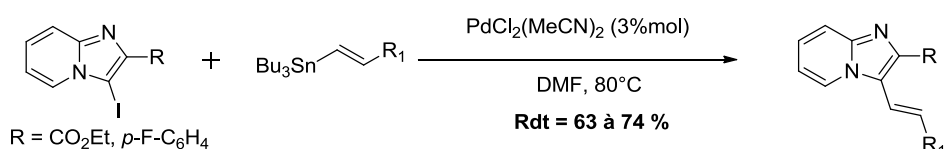


Schéma II- 41

Par ailleurs, il existe des réactions de couplage catalysées par des métaux qui ne nécessitent pas de passer par des intermédiaires halogéno-IP.

III.2.3. Réactions de métallation

La métallation consiste à former une ou plusieurs liaisons σ carbone-métal à partir d'un composé organique. Le produit obtenu est alors appelé composé organométallique. Plusieurs types de métaux ont été décrits pour fonctionnaliser l'IP en position 3. On peut distinguer les réactions

utilisant les métaux de transition comme les dérivés du palladium ou utilisant les métaux alcalins comme les dérivés lithiés.

➤ Utilisation de métaux de transition

Ces réactions permettent de réaliser une fonctionnalisation directe de la position 3 par un noyau aromatique ou par une fonction alcynyle sans passer préalablement par un intermédiaire halogéné.

J. Koubachi et *al.* ont décrit en 2010, une réaction d'arylation intramoléculaire de dérivés *N*, *N*-imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxamides disubstitués sous irradiations microondes en présence d'un catalyseur au palladium (Schéma II- 42). Une série de pyrido-imidazoquinazolinones (*n*=0) et de pyrido-imidazo-azépinones (*n*=1) ont été ainsi obtenues avec de très bons rendements.²⁷¹

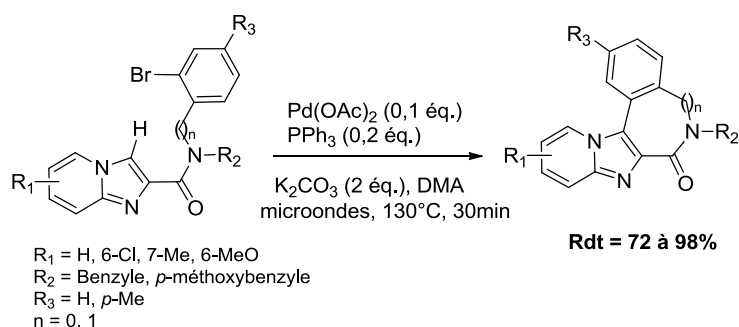
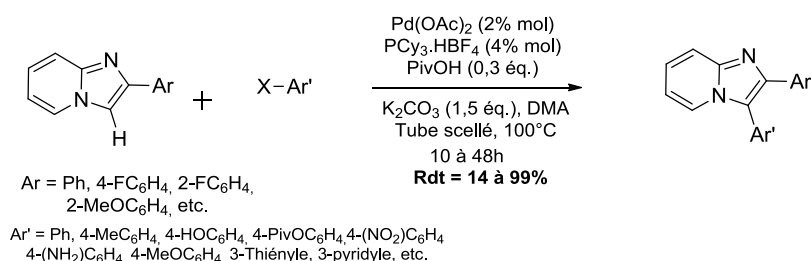


Schéma II- 42

En 2012, S. Marhadour et *al.* ont décrit la synthèse de composés 2,3-diarylimidazo[1,2-*a*]pyridines par arylation directe à partir de dérivés 2-arylimidazo[1,2-*a*]pyridine et d'halogénures d'aryles. De nombreux halogénures d'aryles sont tolérés tels que le bromobenzène, l'acétate de 4-iodophényle, les bromures de nitro-, cyano-, éthoxycarbonyl-, méthoxyphényles, les bromures de pyridyle et de pyrimidyle. Toutefois, le 3-bromothiophène ne se prête pas bien à la réaction d'arylation directe de l'IP car il se dégrade dans le milieu réactionnel.²²⁵



PCy₃.HBF₄ = Tricyclohexylphosphine tétrafluoroborate ; *PivOH* = acide pivalique
DMA = diméthylacétamide

Schéma II- 43

Récemment, J. Xiaoming et *al.* ont décrit l'introduction directe de groupes alcynyles sur de nombreux cycles (hétéro)aromatiques dont l'imidazo[1,2-*a*]pyridine, en utilisant des alcynes vrais en présence d'oxyde d'argent et d'une quantité catalytique de palladium. Cette approche a pour avantage de ne pas nécessiter une halogénéation préalable de l'hétérocycle avant l'introduction du groupe alcynyle. D'autre part, la réaction est compatible avec de nombreux groupes fonctionnels tels que les groupes esters, cétones, halogènes, aldéhydes, alcényles, etc. Toutefois, lorsque des alcynes aliphatiques sont utilisés, le produit d'intérêt n'est observé qu'à l'état de traces.²⁷²

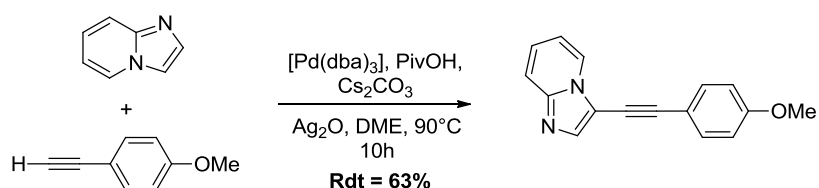


Schéma II- 44 : C-3 alcynylation directe de l'IP par couplage de Sonogashira.
dba = dibenzylidène acétone ; *PivOH* = acide pivalique ; *DME* = diméthoxyéthane

Le mécanisme d'alcynylation est décrit dans le schéma II-41. Deux voies ont été proposées pour expliquer la formation du produit désiré (voies A et B). Dans la voie **A**, le dérivé alcynyle d'argent généré *in situ* subit une transmétallation avec le palladium (II) pour former l'intermédiaire alcynyl-palladium **L42**. Ce dernier attaque l'hétérocycle *via* une réaction de métallation-déprotonation concertée pour générer l'intermédiaire **L43**. Une élimination réductive subséquente conduit au produit désiré **L44**. Une oxydation du Pd⁰ en Pd^{II} par l'argent (Ag^I) permet de rendre à nouveau disponible le palladium pour un nouveau cycle catalytique. Dans la voie alternative **B**, il se produit une palladation initiale de l'hétérocycle pour donner l'intermédiaire **L45**. Ensuite, une transmétallation de l'argent au palladium donne l'intermédiaire **L43**, lequel subit une élimination réductrice conduisant au composé final **L44**.

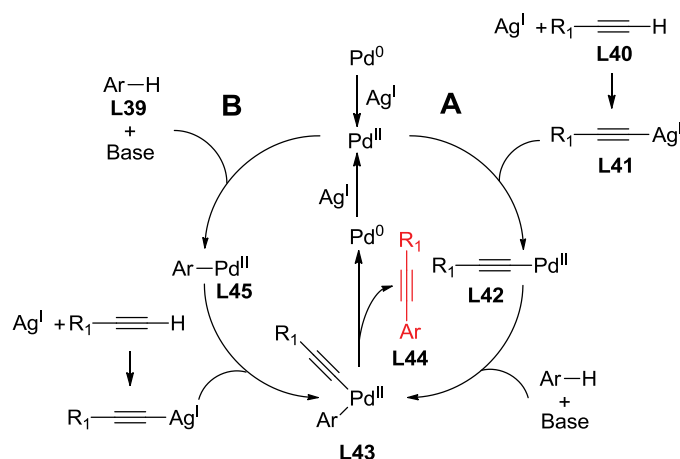


Schéma II- 45 : Mécanisme proposé pour le couplage pallado-catalysé entre hétérocycles et alcynes vrais²⁷²

Récemment, Y. Wang et *al.* ont décrit la synthèse de dérivés 2,3-diarylimidazo[1,2-*a*]pyridines **L48** en deux étapes selon une approche « one-pot » à partir de trois composants : la 2-aminopyridine **L01**, un dérivé 2-bromo-1-aryléthanone **L46** et un dérivé bromoaryle **L47** (Schéma II- 46).

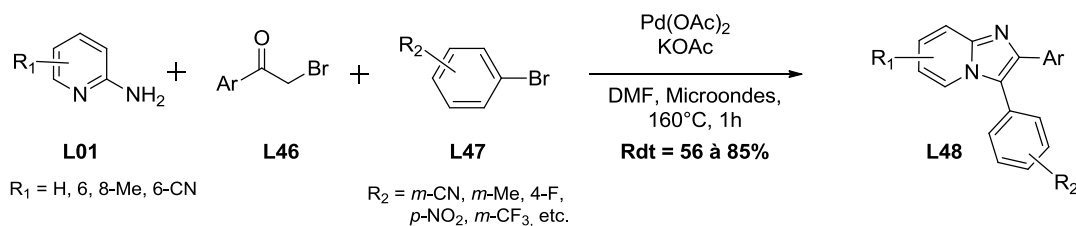


Schéma II- 46

La première étape est la génération du noyau imidazo[1,2-*a*]pyridine à partir des réactifs **L01** et **L46**. Le cycle IP formé subit ensuite une C-H arylation directe avec le dérivé halogéné **L47** pour conduire au composé désiré **L48**. La réaction est pallado-catalysée et s'effectue sous irradiation microondes à 160°C.²⁷³

Le caractère acide du proton en position 3, et dans une moindre mesure du proton en position 5, a été mis à profit pour élargir les possibilités de fonctionnalisation du noyau IP. La formation d'un sel métallique de l'IP permet, en présence de divers électrophiles de fonctionnaliser la position déprotonée.

➤ Utilisation de métaux alcalins

Des dérivés du lithium et du potassium ont été utilisés en série IP. Les dérivés lithiés, très réactifs, sont utilisés comme intermédiaires réactionnels en synthèse organique. L'IP peut subir

une lithiation sur un carbone non substitué en utilisant des composés organolithiens tels que le phényllithium (PhLi), le *tert*-butyllithium (*t*-BuLi), le diisopropylamidure de lithium (LDA) ou le sel de lithium de la 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine (LiTMP) à basse température et dans le tétrahydrofurane anhydre. Le phényllithium et le *tert*-butyllithium orientent la lithiation sur le carbone en position 3 portant un proton acide, tandis que les deux autres lithiens favorisent la déprotonation en position 5 du cycle. La réaction est activée par coordination de l'atome d'azote N4 du cycle au lithium. Cette étape est suivie de l'élimination du proton à échanger par la partie organique de l'organolithien. La sphère de coordination du lithium est complétée par des molécules de tétrahydrofurane, ce qui permet d'aboutir à des dérivés lithiés solubles dans les solvants organiques.

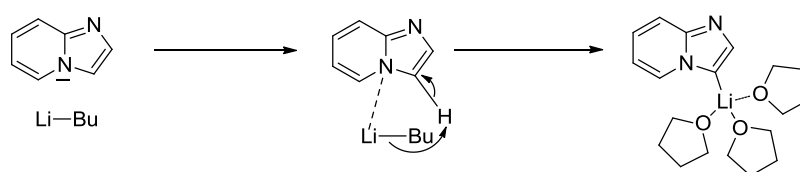


Schéma II- 47

Une des caractéristiques des dérivés lithiés est leur forte réactivité. Les composés lithiés formés à partir de l'IP peuvent être utilisés pour effectuer des substitutions électrophiles. Par exemple, il est possible de procéder à l'acylation du C-3 avec un chlorure d'acyle par formation préalable du dérivé lithié en cette position (Schéma II- 48).

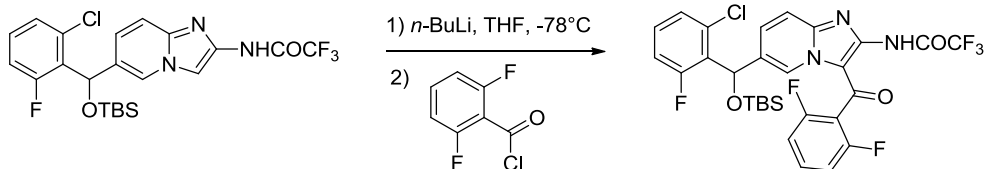


Schéma II- 48

La déprotonation de la position 3 du cycle est également possible par du *tert*-butylate de potassium. C. Hua et *al.* ont utilisé cette propriété pour développer une approche d'arylation directe d'imidazo[1,2-*a*]pyridine avec des bromures, iodures et triflates d'aryles en présence d'iodure de cuivre (CuI). Cette approche s'applique à une grande variété d'halogénures d'aryles. Par ailleurs de nombreux substituants sont tolérés sur le sommet C-2 du cycle IP tels que les groupes triluorométhyle (CF₃) et ester d'éthyle (CO₂Et). L'avantage de cette approche est

l'utilisation d'un catalyseur à base de cuivre, beaucoup moins onéreux que le palladium et l'obtention de très bons rendements.²⁷⁴

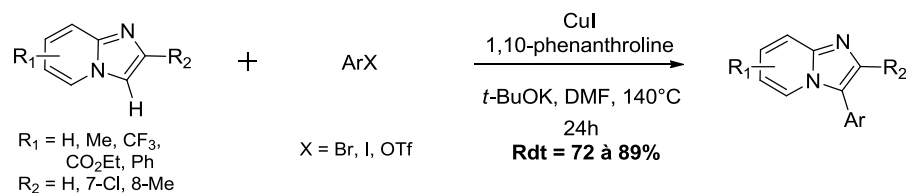


Schéma II- 49

Le mécanisme de la réaction est décrit dans le Schéma II- 50. Tout d'abord, le cycle IP est déprotoné avec le *tert*-butylate de potassium au niveau du sommet 3 pour générer l'intermédiaire **L51**. Une transméallation du composé **L51** avec le cuivre fournit l'intermédiaire **L52**. Ce dernier subit une addition oxydante avec l'iodobenzène pour donner l'intermédiaire **L53** qui conduit au composé désiré **L50**, après une élimination réductrice avec libération du catalyseur.

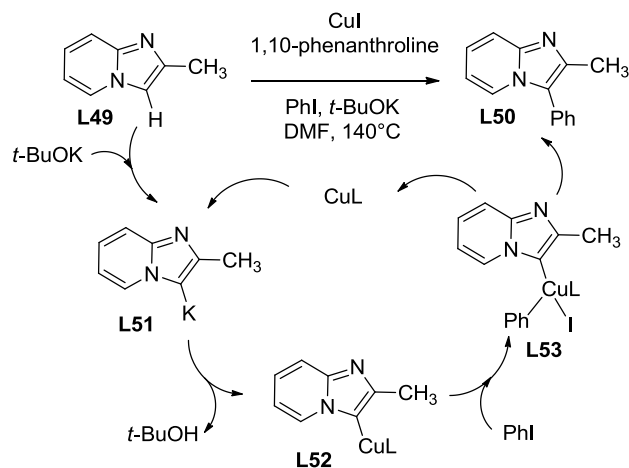


Schéma II- 50 : Mécanisme réactionnel proposé
L : 1,10-phénanthroline

D'autres fonctionnalisations de la position 3, sans utiliser des bases fortes ou des métaux de transition, ont été largement décrites dans la littérature. Il s'agit en particulier des réactions d'alkylation.

III.2.4. Alkylation du noyau IP

La richesse en électrons de la position 3 de l'IP a été mise à profit, pour introduire diverses chaînes alkyles fonctionnalisées selon une réaction de substitution électrophile aromatique. Ainsi, les réactions d'hydroxyméthylation, d'aminométhylation (ou réaction de Mannich) et d'alkylation d'aza-Friedel-Crafts ont été décrites en série IP.

III.2.4.1. Hydroxyméthylation

A. Gueiffier et *al.* ont décrit une hydroxyméthylation directe de l'imidazo[1,2-*a*]pyridine avec le formaldéhyde et l'acétate de sodium en présence d'acide acétique en position 3. Cette réaction permet d'introduire un groupe hydroxyméthyle en position 3 afin d'aboutir aux alcools méthyliques correspondants. Ces derniers peuvent ensuite être engagés dans des réactions de substitutions nucléophiles.²⁷⁵

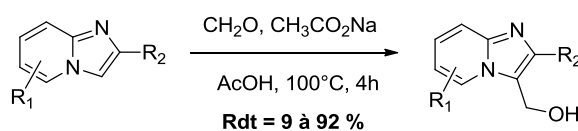


Schéma II- 51

III.2.4.2. Réaction de Mannich

La réaction de Mannich est une méthode classique de préparation de β -aminocétones (ou bases de Mannich) à partir d'un composé carbonyle énoisable, d'un aldéhyde et d'une amine. Cette réaction dont l'importance a été mise en évidence par Karl Mannich au 19^{ème} siècle, est fondamentale en synthèse organique. C'est l'une des méthodes qui permet de créer facilement des liaisons C-C. En 1965, Luigi Almirante et *al.* ont décrit la synthèse de dérivés aminométhyl-IP en utilisant la réaction de Mannich à partir d'imidazo[1,2-*a*]pyridines, de formaldéhyde et d'amines secondaires dans de l'acide acétique glacial. Ils ont ainsi synthétisé une dizaine de bases de Mannich avec de très bons rendements comme l'illustre l'exemple représenté dans le Schéma II- 52.²⁷⁶

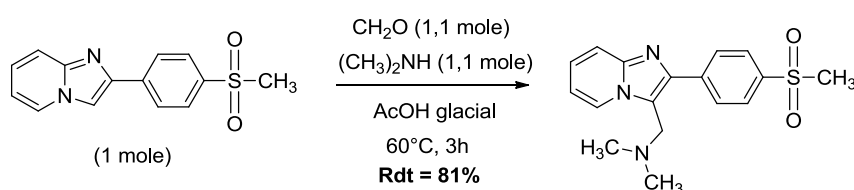


Schéma II- 52 : Synthèse de dérivés 2-(aryl)-3-diméthylaminométhyl-IP selon l'approche de Mannich

La réaction de Mannich a été par la suite appliquée à la synthèse de nombreux dérivés imidazo[1,2-*a*]pyridines, et peut constituer une des étapes pour synthétiser le zolpidem (STILNOX®).²⁷⁷

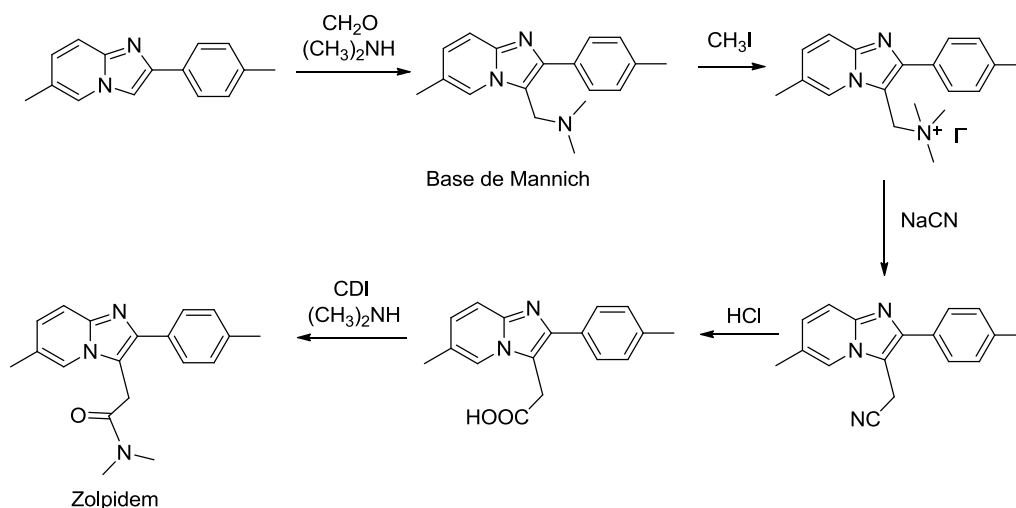


Schéma II- 53 : Synthèse du zolpidem *via* l'amino-méthylation de Mannich

III.2.4.3. Réaction d'aza-Friedel-Crafts

En 2011, notre équipe a décrit la synthèse de dérivés 2-amino-1,3-thiazoles polysubstitués *via* une réaction tandem d'aza-friedel-crafts/cyclisation de Hantzsch à partir du noyau IP. La réaction multi-composants entre la 2-méthylimidazo[1,2-*a*]pyridine, un aldéhyde et la thiourée conduit à la formation de dérivés mono-alkylés de la thiourée. La réaction est catalysée par le tétrachlorure de titane ou le chlorhydrate de thiamine.²⁷⁸ Ces thiourées monosubstituées ont été ensuite cyclisées en présence de dérivés α -halogénocarbonylés pour donner des dérivés 2-amino-1,3-thiazoles.

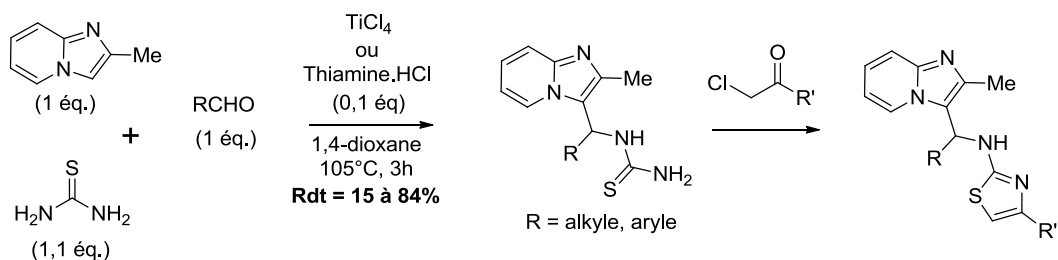


Schéma II- 54

Cette réaction a été étendue par K. Pericherla et *al.* pour accéder à des dérivés 1-amidométhyl-imidazo[1,2-*a*]pyridines, en remplaçant la thiourée par l'acétamide (AcNH₂). La réaction est catalysée par du triflate d'ytterbium Yb(OTf)₃. Cette approche conduit à deux composés : le dérivé *N*-amidométhylimidazo[1,2-*a*]pyridine attendu **L57** et un dérivé bis(imidazo[1,2-*a*]pyridine) **L58**.²⁷⁹

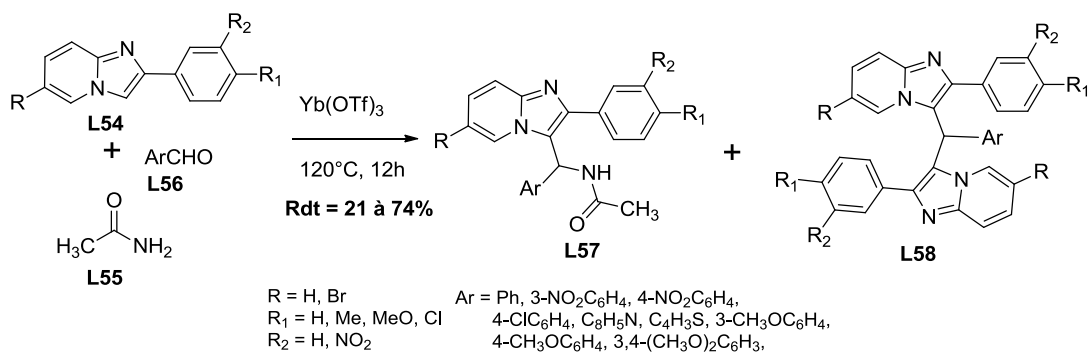


Schéma II- 55

Le mécanisme de la réaction est détaillé dans le Schéma II- 56. L'imidazo[1,2-*a*]pyridine réagit sur l'aldéhyde activé par l'acide de Lewis Yb(OTf)_3 , pour donner l'alcool intermédiaire **L60**. L'alcool **L60** génère l'intermédiaire **L62** par perte du groupement hydroxyle en présence de Yb(OTf)_3 . Le composé **L62** subit enfin une attaque nucléophile de l'amine de l'acétamide pour donner le produit d'intérêt **L57** (voie a). Toutefois, l'intermédiaire **L62** peut être également attaqué par une autre molécule d'imidazo[1,2-*a*]pyridine **L59** et donner ainsi le dérivé bis(imidazo[1,2-*a*]pyridine) **L58** (voie b).

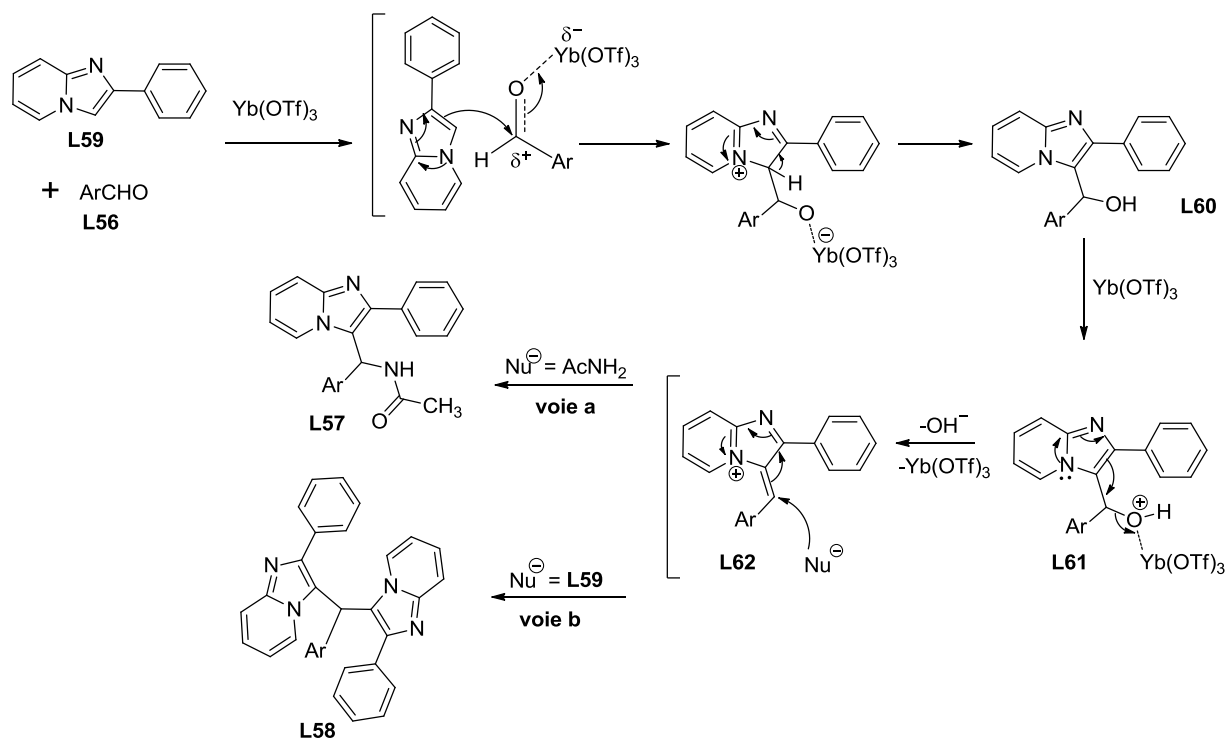


Schéma II- 56 : Mécanisme proposé pour la formation des dérivés 1-amidométhyl-imidazo[1,2-*a*]pyridines

La nature du substituant sur le phényle en C-2 a une influence sur le ratio produit d'intérêt **L57** / dérivé secondaire **L58**. Ainsi, la présence d'un groupement électrodonneur sur le noyau phényle augmente le caractère nucléophile de la position C-3 de l'IP, favorisant la voie b et donc la formation du produit **L58**. Inversement, la présence d'un groupe électro-attracteur, tel que le groupe nitro, diminue la réactivité de l'IP et offre un meilleur rendement pour le produit **L57**.

L'introduction de reste acyle est également possible sur le cycle IP en position 3 et constitue une fonctionnalisation importante en chimie organique.

III.2.5.Acylation du noyau IP

Une revue de la littérature fait remarquer que la C-3 acylation, s'effectue généralement pendant la synthèse du bicyclic IP en utilisant lors de la réaction de condensation un dérivé α -bromo- β -cétoester (*Cf.* section II.2.). Toutefois, l'introduction d'un reste acyle est également possible sur un carbone C-3 non fonctionnalisé, en utilisant des réactions de substitution électrophile aromatique. Ainsi, la formylation et l'acylation ont été décrites dans la littérature.

➤ Réactions de formylation de l'IP

De nombreux travaux décrivent la fonctionnalisation de la position 3 de l'IP par un groupe formyle selon les conditions de Vilsmeier-Haack.^{170, 275, 280, 281}

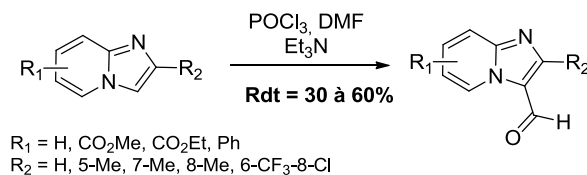


Schéma II- 57

La réaction de Vilsmeier-Haack permet d'accéder aux dérivés 3-formyl-IP avec des rendements généralement moyens. Toutefois, les travaux de N. Masurier et *al.* ont démontré que lorsque le cycle IP est substitué par un groupe amide en C-2, C-6, C-7 ou C-8, les conditions de Vilsmeier-Haack sont inefficaces. Dans ce cas, la formylation de Duff reste la meilleure alternative. La réaction de Duff utilise l'hexaméthylènetétramine (HMTA) en milieu acide (l'acide acétique dans le cas de l'IP).²⁸⁰

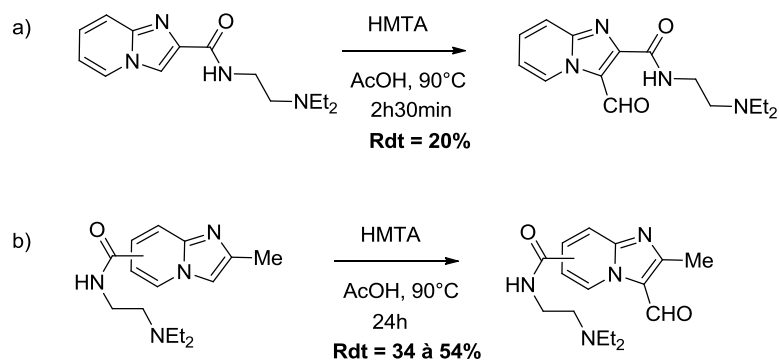


Schéma II- 58 : Formylation de l'IP par la méthode de Duff
a) Chaîne amidique en C-2 ; b) chaîne amidique en C-6, C-7 ou C-8.

Il est couramment admis que le mécanisme de la réaction de Duff passe par la formation d'une espèce électrophile, formée à partir de l'HMTA en milieu acide. Cet intermédiaire est ensuite déshydrogéné en imine qui, après hydrolyse, conduit à l'aldéhyde correspondant.

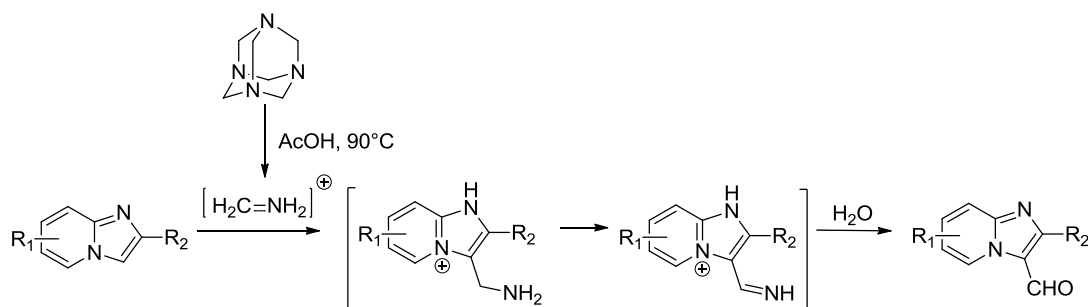


Schéma II- 59 : Mécanisme supposé de la réaction de Duff (adapté de Y. Ogata et *al.*)²⁸²

Cependant, il a été observé que lorsque la chaîne amidique se situe en position 5 du cycle, le dérivé aldéhydique n'est pas obtenu. Dans ce cas, on observe la formation d'un dérivé tricyclique par réaction de *péri*-annélation. La formation de ce dérivé tricyclique pourrait s'expliquer par l'attaque de l'amine de l'intermédiaire réactionnel sur la fonction carbonyle de l'amide.

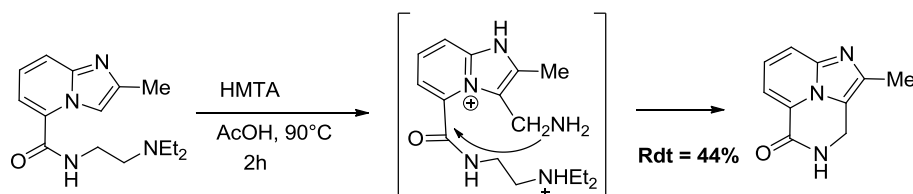


Schéma II- 60 : Formation du tricycle par réaction de *péri*-annélation.²⁸⁰

➤ Autres réactions d'acylation de l'IP

En 1998, S. Chayer et *al.* ont décrit une méthode de *C*-acylation directe d'imidazo[1,2-*a*]pyridines avec un excès de chlorure d'acyle. La réaction passe initialement par une *N*-1 acylation pour former un intermédiaire *N*-acyl-imidazolium. Ensuite, il y a un transfert du groupe acyle vers le sommet C-3 de l'IP sous conditions thermiques.²⁸³

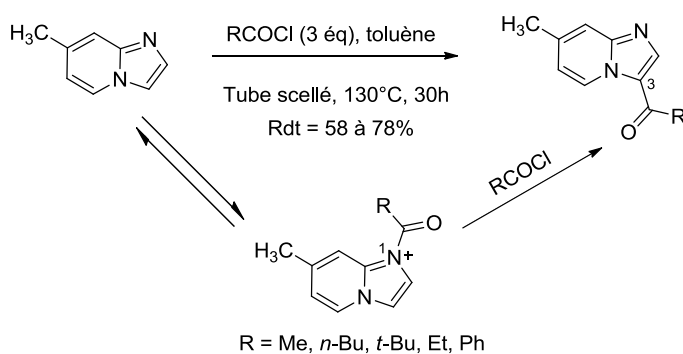


Schéma II- 61

Au final, on observe d'une façon générale, que les réactions de substitution électrophile s'effectuent principalement sur la position 3 de l'IP, permettant ainsi d'accéder à des dérivés IP mono ou polyfonctionnalisés. Ces derniers peuvent ensuite être utilisés comme des intermédiaires réactionnels pour la synthèse de molécules incorporant un motif IP. Par ailleurs, les réactions d'acylation et d'alkylation directe du cycle IP en position 3 sont peu décrites. Les principales réactions documentées nécessitent des conditions drastiques, et ont été pour la plupart, effectuées sur des dérivés 2-alkyl- ou 2-arylIP. Dans notre laboratoire, des travaux récents ont montré que dans le cas de la 2-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridine, les réactions d'acylation pouvaient se faire dans des conditions douces.

III.3. Travaux antérieurs au sein du laboratoire

Au sein de l'équipe « Chimie des Acides Aminés, Hétérocycles et Chimie supportée » de l'Institut des Biomolécules Max-Mousseron (IBMM), notre équipe a pu montrer que la 2-amino-IP pouvait être acylée par des acides aminés, dont la fonction amine est protégée par un groupement *tert*-ButylOxyCarbonyl (BOC) (Schéma II-62). La réaction a lieu en présence d'agents de couplage (EDC et HOBT) et d'une base (triéthylamine) à température ambiante.²⁸⁴ Dans ces conditions, le dérivé *N*-acylé **L64** n'est détecté qu'à l'état de traces et le composé majoritaire correspond au dérivé C3-acylé **L65**. Cinq acides aminés ont ainsi été étudiés (Boc-L-Phe-OH, Boc-D-Phe-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Pro-OH et Boc-Thr(OBn)-OH) et les produits de C-3 acylation ont été isolés avec des rendements de 61 à 88%.

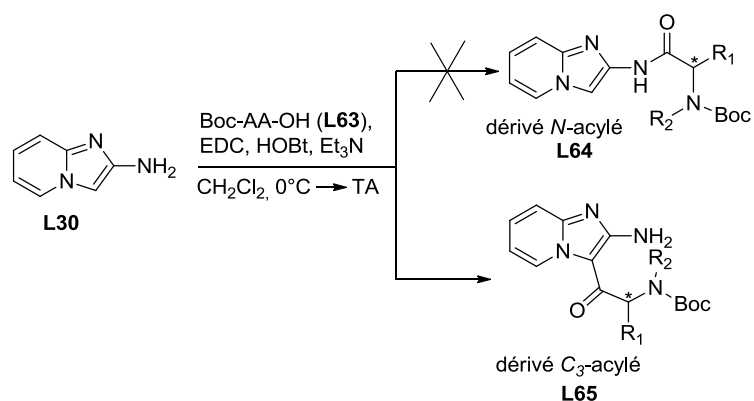
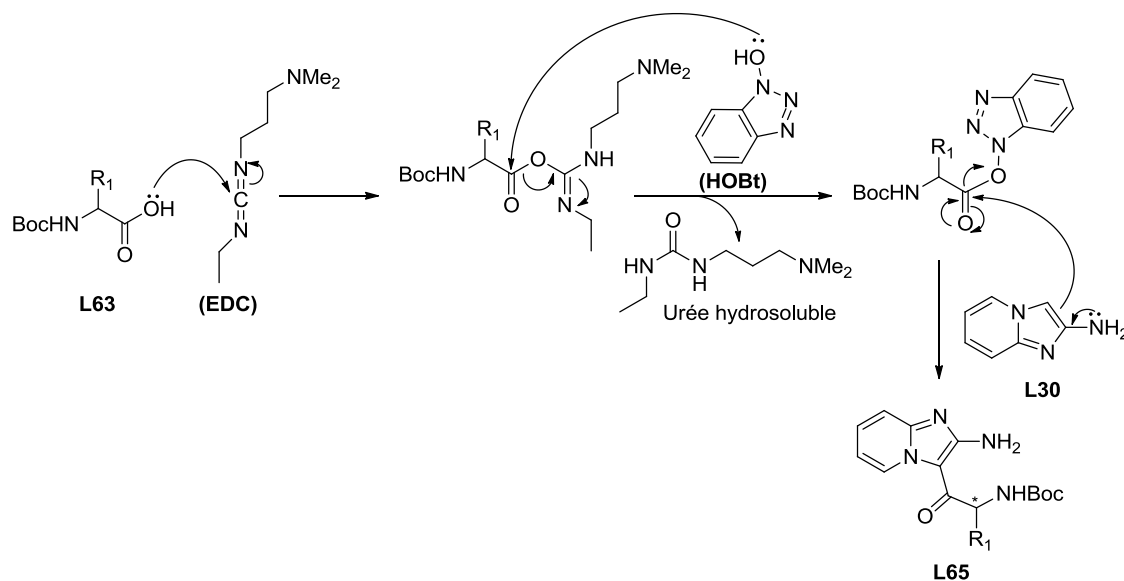


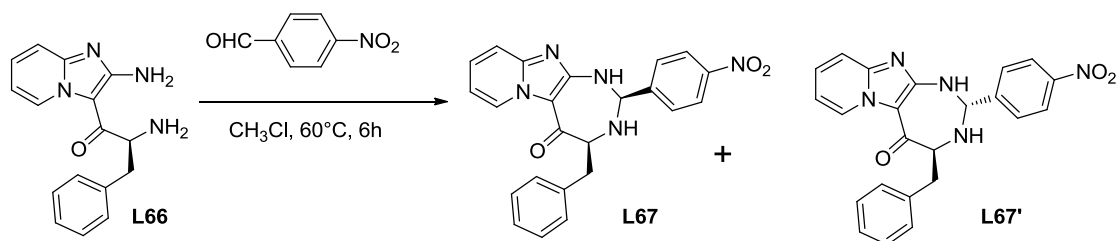
Schéma II- 62 : Synthèse des composés C-acylés **L65**

Cette réactivité particulière de la position 3 du cycle imidazo[1,2-*a*]pyridine peut s'expliquer par une réactivité de type « ène-amine ». Par sa délocalisation dans le cycle, le doublet

de l'atome d'azote de l'amine exocyclique enrichit en électrons le sommet 3 du cycle, permettant ainsi l'attaque de l'ester actif de l'acide aminé comme illustré ci-après (Schéma II- 63).



Ces dérivés acylés en position 3 ont alors permis d'accéder au motif 1,3-diazépine fusionné avec l'IP. Après déprotection du composé **L65** en milieu acide chlorhydrique, le dérivé diamine a été cyclisé avec le *para*-nitrobenzaldéhyde selon le schéma réactionnel suivant :



Les diastéréoisomères obtenus ont été séparés par chromatographie sur gel d'alumine. Une structure cristallographique de ces diastéréoisomères a pu être générée et a permis de prouver de manière non ambiguë la C3-acylation du motif IP (Figure II- 11).

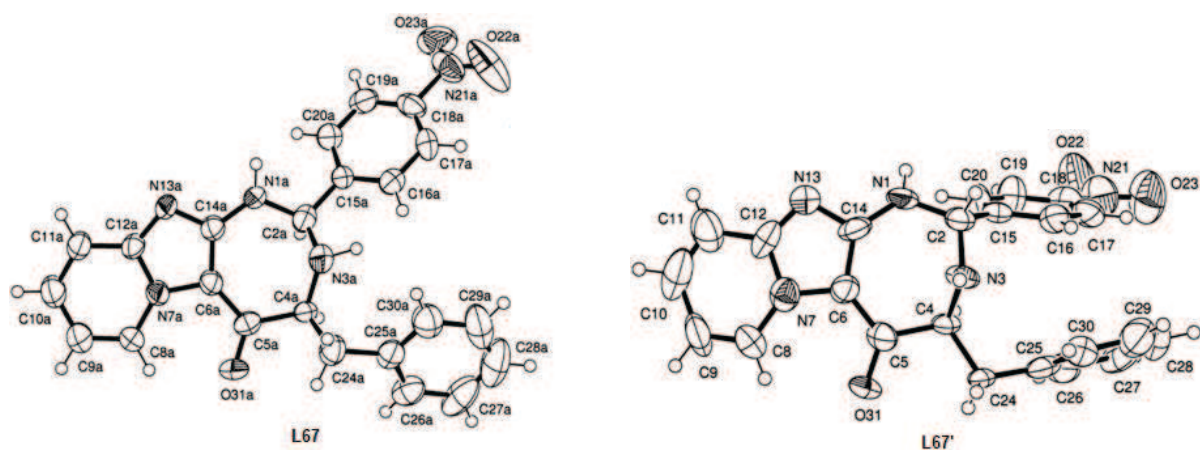


Figure II- 11 : Structures cristallographiques des diastéréoisomères **L67** et **L67'**

Il est à noter que ces dérivés amins sont facilement hydrolysables. Ils ont donc été oxydés pour augmenter leur stabilité. Une librairie de pyrido-imidazo-1,3-diazépin-5-ones a pu ainsi être synthétisée selon une approche cyclisation-oxydation *in situ*.

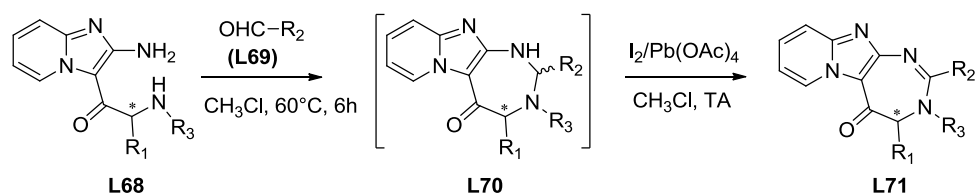


Schéma II- 65 : Obtention des composés cycliques **L71**

Dans le Tableau II- 6, sont répertoriés quelques composés de type **L71**, synthétisés selon cette approche.²⁸⁴



Entrée	R ₁	R ₃	R ₂	Rdt (%)
1	(S)-CH ₂ C ₆ H ₅	H	<i>o</i> -MeC ₆ H ₄	47
2	(R)-CH ₂ C ₆ H ₅	H	<i>p</i> -BrC ₆ H ₄	79 ^a
3	(S)-CH ₂ C ₆ H ₅	H	<i>p</i> -MeC ₆ H ₄	41
4	(S)-CH ₂ C ₆ H ₅	H	<i>m</i> -MeC ₆ H ₄	54
5	(S)-CH ₂ C ₆ H ₅	H	<i>p</i> -MeOC ₆ H ₄	34
6	(S)-CH ₂ C ₆ H ₅	H	H	ND ^b
7	(S)-CH ₂ C ₆ H ₅	H	H	100 ^c
8	(S)-Me	H	<i>p</i> -NO ₂ C ₆ H ₄	52
9	(S)-Me	H	<i>p</i> -BrC ₆ H ₄	52
10	(S)-Me	H	C ₆ H ₄	55
11	(S, S)-CH(OBn)-Me	H	<i>p</i> -BrC ₆ H ₄	46
12	(S, S)-CH(OBn)-Me	H	C ₆ H ₄	57
13	(S, S)-CH(OBn)-Me	H	<i>p</i> -MeC ₆ H ₄	58
14	[(CH ₂) ₃] _c		<i>p</i> -NO ₂ C ₆ H ₄	54
15	[(CH ₂) ₃] _c		C ₆ H ₄	73
16	[(CH ₂) ₃] _c		<i>p</i> -MeC ₆ H ₄	58

Tableau II- 6 : composés IP-diazépinones synthétisés à partir des dérivés C3-acyles-IP
ND : non détecté. ^a Déterminé par HPLC chirale. ^b Synthétisé en utilisant le paraformaldéhyde.
^c Synthétisé en utilisant le triméthylorthoformate.

Les composés ainsi obtenus ont été évalués quant à leur capacité à inhiber les cibles de type kallicréines. Ceci sera détaillé dans le chapitre suivant.

PARTIE III - TRAVAUX PERSONNELS

I. PRÉSENTATION DU PROJET

Au sein de l'équipe « Chimie des Acides Aminés, Hétérocycles et Chimie supportée » de l'Institut des Biomolécules Max-Mousseron (IBMM), l'une des thématiques de recherche porte sur la conception d'inhibiteurs enzymatiques. Comme cela a été rappelé dans la partie I du manuscrit, une dérégulation de l'activité des kallikréines humaines 5 et 7 (KLK5 et 7) est impliquée dans plusieurs atteintes dermatologiques, telles que les dermatites atopiques, certaines formes de psoriasis et d'eczéma. De plus, il est à noter qu'une mutation du gène codant pour la protéine LEKTI 1, inhibiteur naturel de ces protéases, est responsable du syndrome de Netherton, correspondant à une ichtyose sévère du nouveau né. Cette mutation entraîne une perte de l'inhibition des KLK5 et 7, et est à l'origine d'un bouleversement majeur dans l'équilibre inhibition/activation de ces protéases, mettant en jeu le pronostic vital du malade. Outre leur implication majeure dans des atteintes dermatologiques, il a été montré récemment que ces protéases jouent un rôle important dans les processus d'invasion tumorale, et de dissémination métastatique. Notamment, la KLK7 est impliquée dans l'invasion et la progression du cancer de la prostate, de l'ovaire et du pancréas, du fait de sa capacité à hydrolyser plusieurs sous-types de cadhérines. En raison de la dérégulation de la KLK7 dans plusieurs processus physiopathologiques, notamment en cancérologie, il nous a semblé pertinent d'initier un projet de recherche dans le but de développer des inhibiteurs sélectifs de KLK7.

Avant mon arrivée au laboratoire, 65 molécules hétérocycliques issues de chimiothèques internes, incluant les dérivés pyrido-imidazodiazépine, 2-hydrazino-1,3-thiazole et 2-amino-1,3-thiazole, ont été sélectionnées pour un criblage initial sur cinq protéases dont la KLK7. A l'issue de ce criblage, des composés possédant un motif imidazo[1,2-*a*]pyridine fusionné à un cycle [1,3]diazépinique ont été identifiés comme des inhibiteurs potentiels de la KLK7 (Figure III- 1). Ce criblage a été réalisé par l'équipe de biologie cellulaire et du vieillissement, de l'Université Pierre et Marie Curie de Paris.

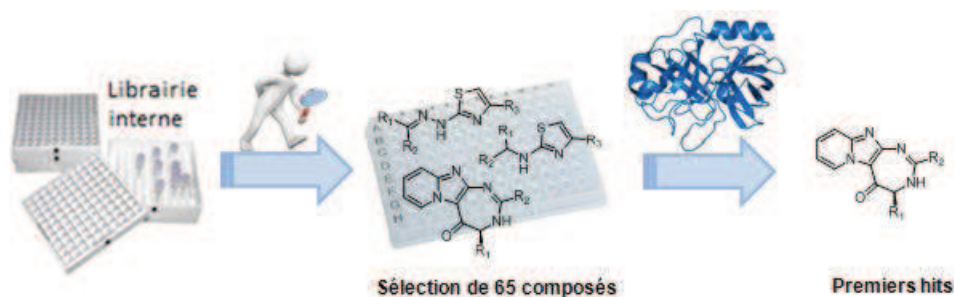
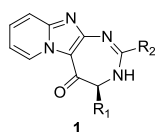


Figure III- 1 : Structure générale des premiers inhibiteurs de la KLK7 issus du criblage

L'effet inhibiteur de chaque composé a été quantifié par la détermination des concentrations inhibitrices à 50% (IC_{50}). Le peptide Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC est le substrat utilisé pour la KLK7. La constante de Michaelis-Menten K_m pour ce substrat, est de 317 μM . L'activité enzymatique est mesurée en détectant la libération du groupe fluorescent AMC (7-amino-4-méthylcoumarine). Les longueurs d'onde d'excitation (λ_{exc}) de 360 nm, et d'émission (λ_{em}) de 460 nm ont été utilisées. Les résultats des meilleurs inhibiteurs sont rapportés dans le Tableau III- 1



Entrée	Composé	R ₁	R ₂	% Inhibition à 50 μM	IC ₅₀ (μM)
1	JMV4912	(S)-CH ₂ C ₆ H ₅	<i>p</i> -MeOC ₆ H ₄	43	72 \pm 1,9
2	JMV4833	(S)-CH ₂ C ₆ H ₅	<i>m</i> -MeC ₆ H ₄	33	ND
3	JMV4968	(S)-CH ₂ C ₆ H ₅	<i>p</i> -MeC ₆ H ₄	39	68 \pm 3,1
4	JMV4967	(S)-CH ₂ C ₆ H ₅	<i>o</i> -MeC ₆ H ₄	52	57 \pm 1,0
5	JMV4974	(S,S)-CH(CH ₃)OBn	<i>p</i> -BrC ₆ H ₄	46	59 \pm 2,2

Tableau III- 1 : Activité inhibitrice des premiers hits sur la KLK7. ND = non déterminé

Les premiers hits issus de ce criblage initial correspondent à des dérivés de la phénylalanine (entrées 1 à 4) et de la thréonine protégée (entrée 5). Ils se caractérisent par la présence d'un noyau aromatique différemment substitué en tant que résidu R₂. Une étude biochimique du meilleur inhibiteur, le JMV4967, a permis de mettre en évidence son caractère réversible et compétitif vis-à-vis du substrat dans le site actif de la KLK7. En effet, une haute dilution du complexe enzyme-inhibiteur permet de restaurer plus de 90% de l'activité enzymatique initiale, indiquant que l'inhibition est réversible. Le caractère

compétitif, déterminé grâce à la représentation en double-inverse de Lineweaver-Burk, est attestée par la non variation de la vitesse maximale de la réaction enzymatique (V_{\max}) (Figure III- 2, droite).

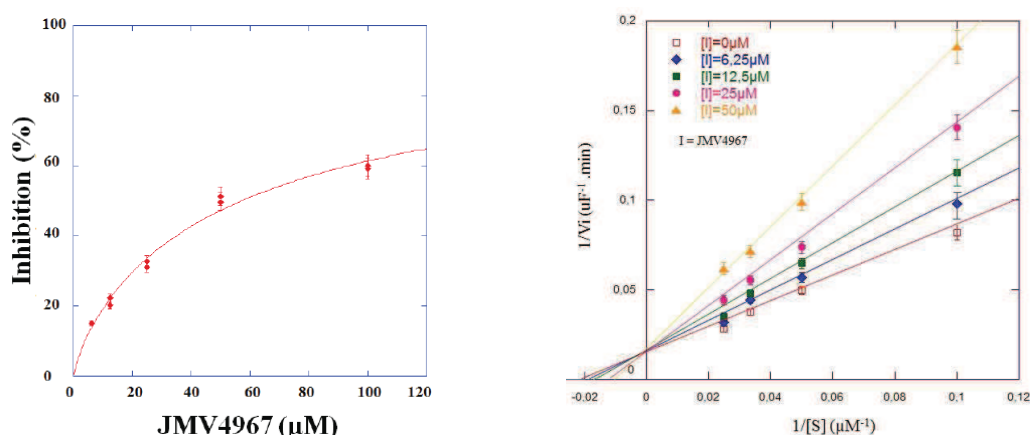


Figure III- 2 : Étude cinétique du composé JMV 4967
Courbe IC_{50} (à gauche). Représentation de Lineweaver & Burk (à droite)

Ce premier criblage a conduit à l'identification d'une première génération de composés IP-diazépiniques capable d'inhiber la KLK7. Des études biochimiques approfondies ont permis la découverte d'un premier hit, le JMV4967, possédant une activité inhibitrice modérée vis-à-vis de la KLK7 ($IC_{50} = 57 \pm 1,0 \mu M$). Il est à noter que parmi les cinq protéases testées (KLK 5, 7, 8, 14 et matriptase), ces composés se sont montrés sélectifs de la KLK7, l'inhibition des 4 autres protéases étant inférieure à 30%, à la dose de 50 μM . Ce composé présente donc l'intérêt d'être sélectif à l'égard de la KLK7, contrairement aux inhibiteurs synthétiques déjà décrits dans la littérature.

La présente étude est motivée par la volonté de concevoir des inhibiteurs réversibles et sélectifs de la KLK7. Nous nous sommes donc attachés dans un premier temps, à étudier cette famille de composés pyrido-imidazodiazépiniques. En particulier, une étude de relation structure-activité (RSA) a été menée autour des premiers hits identifiés, afin de déterminer les éléments structuraux essentiels pour l'activité inhibitrice. Ces résultats seront exposés dans une première partie. Par ailleurs, dans le cadre d'un criblage de composés commerciaux, notre partenaire biochimiste a identifié un dérivé quinazolinone capable d'inhiber la KLK7 de manière sélective et réversible ($IC_{50} = 25,1 \mu M$).²⁸⁵ Nous avons donc choisi d'explorer cette autre famille de composés, dans un second temps. Enfin dans une troisième partie, seront

présentés les travaux initiés pour synthétiser d'autres dérivés diazépiniques originaux fusionnés avec l'imidazo[1,2-*a*]pyridine et l'indole.

II. SYNTHÈSE D'ANALOGUES IP-DIAZÉPINIQUES

Identifié à la suite d'un criblage, le JMV4967, a constitué le point de départ de notre étude. Afin de déterminer les substituants impliqués dans l'interaction avec la KKL7, nous avons envisagé la synthèse de trois séries de composés dérivés du JMV4967 : des composés « urée » (série 1), des dérivés IP-diazépinones diversement fonctionnalisés (série 2), et des dérivés C3-acyle-IP qui peuvent être considérés comme des dérivés amides ou des dérivés pyrido-imidazodiazépinones ouverts (série 3). Les trois séries sont développées à partir d'un intermédiaire commun « diamine » **6**, qui lui-même est obtenu à partir de la 2-amino-IP **4** (Schéma III- 1).

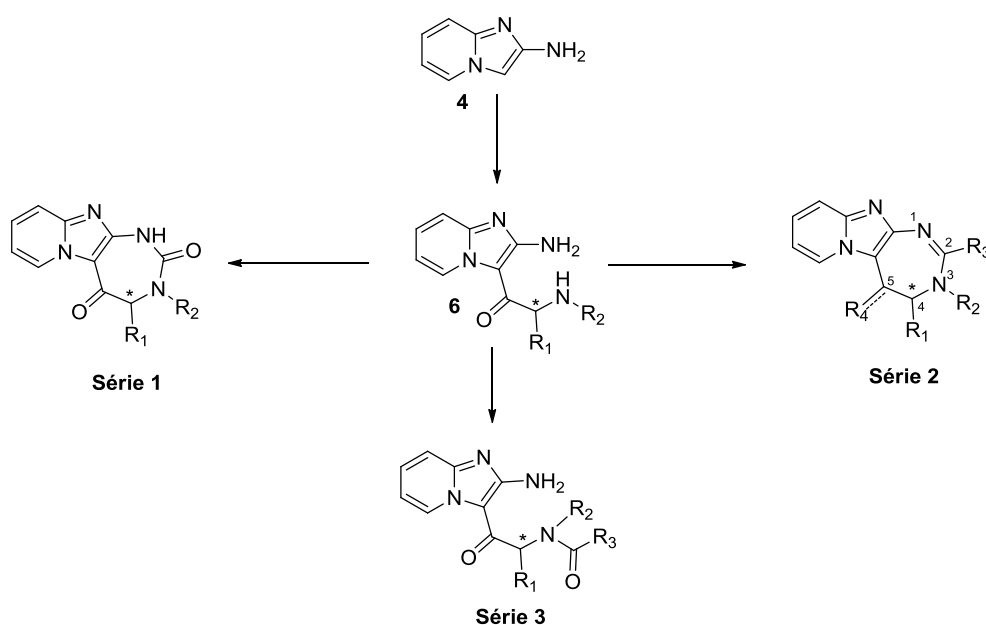


Schéma III- 1 : Séries de composés étudiés

L'obtention de la 2-amino-IP **4**, synthon de base pour accéder aux séries 1, 2 et 3 *via* l'intermédiaire clé « diamine » **6** est décrite ci-après.

II.1. Synthèse de la 2-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridine **4**

La 2-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridine **4** est préparée selon la méthode décrite par C. Hamdouchi et *al.* pour des dérivés substitués sur le noyau pyridinique²⁴⁹ (Schéma III- 2).

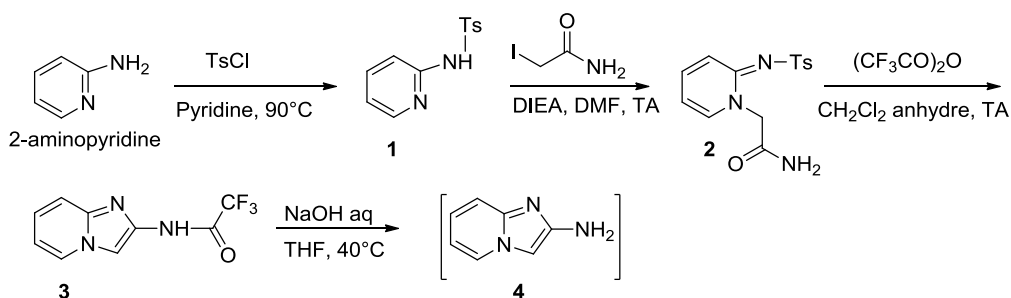


Schéma III- 2 : Synthèse de la 2-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridine **4**

La première étape est une réaction de sulfonation de l'amine de la 2-aminopyridine avec le chlorure de tosylo, à reflux de la pyridine. Le composé **1** s'obtient après précipitation, filtration et lavage à l'eau avec un rendement quantitatif.

La seconde étape est une attaque nucléophile de l'azote endocyclique sur l'iodoacétamide selon un mécanisme de substitution nucléophile. La présence de diisopropyléthylamine (base de Hünig) dans le milieu permet de capter le proton libéré au cours de la réaction. Le composé **2** est obtenu après évaporation du solvant (DMF), et lavage à l'eau avec un rendement de 91%. L'électrocyclisation du composé **2** en présence de deux équivalents d'anhydride trifluoroacétique, dans le dichlorométhane en milieu anhydre, conduit au dérivé trifluoro-*N*-imidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl-acétamide **3**. Le mécanisme proposé pour cette cyclisation est présenté sur le Schéma III- 3.

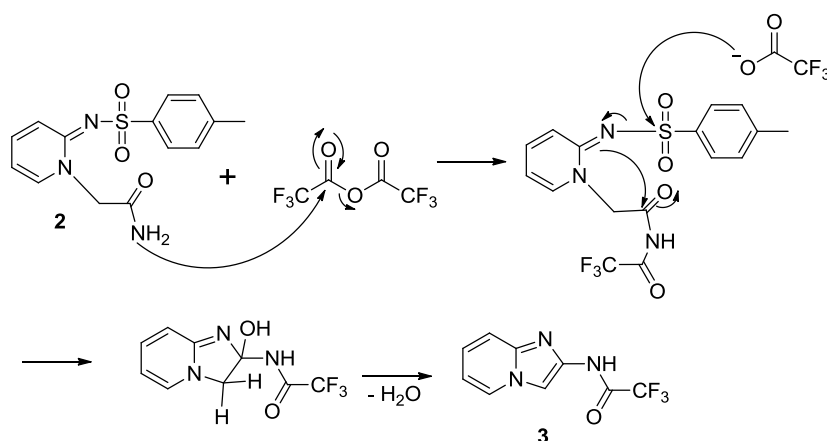


Schéma III- 3 : Mécanisme proposé pour l'étape d'électrocyclisation

L'analyse LC-MS du produit de cette réaction d'électrocyclisation révèle la présence de deux composés de même masse ($[M+H]^+ = 230,1$) ayant des temps de rétention différents dans un rapport environ 80/20 (mesuré à 214 nm). Trois composés peuvent être envisagés : le

dérivé 2-trifluoroacétamide attendu **3**, le dérivé 3-trifluoroacétamide issu d'un réarrangement de Dimroth du composé précédent (dérivé **3'**) ou le dérivé acylé **3''**. Ce dernier composé pourrait être issu d'une acylation par l'anhydride trifluoroacétique de la 2-amino-IP, elle-même provenant d'une déprotection partielle du dérivé **3** dans le milieu réactionnel.

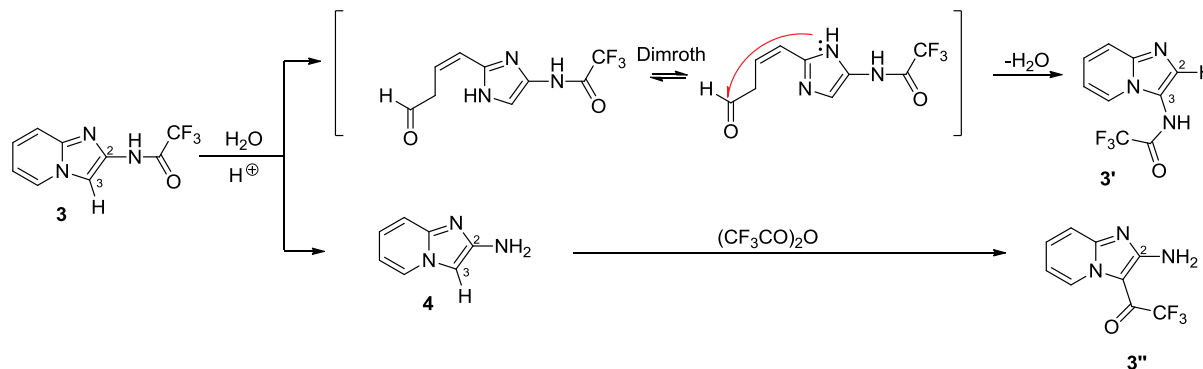


Schéma III- 4 : Hypothèses de formation du produit minoritaire

Une analyse RMN du proton met en évidence l'existence de 2 systèmes distincts de protons aromatiques dans un ratio d'environ 80/20 (Figure III- 3). Le composé majoritaire **3** présente les quatre protons du cycle pyridinique (doublet dédoublé à 6,90 ppm pour le H-6, doublet dédoublé à 7,28 ppm pour le H-7, doublet à 7,49 ppm pour le H-8, et doublet à 8,16 ppm pour le H-5). On note également la présence d'un singulet à 8,18 ppm, correspondant à un proton du cycle imidazolique de l'IP. Celui-ci est corrélé avec un carbone à 103 ppm. Ces valeurs sont en accord avec les données structurales rapportées dans la littérature pour d'autres dérivés 2-trifluoroacétamide de l'IP.^{248, 249, 286}

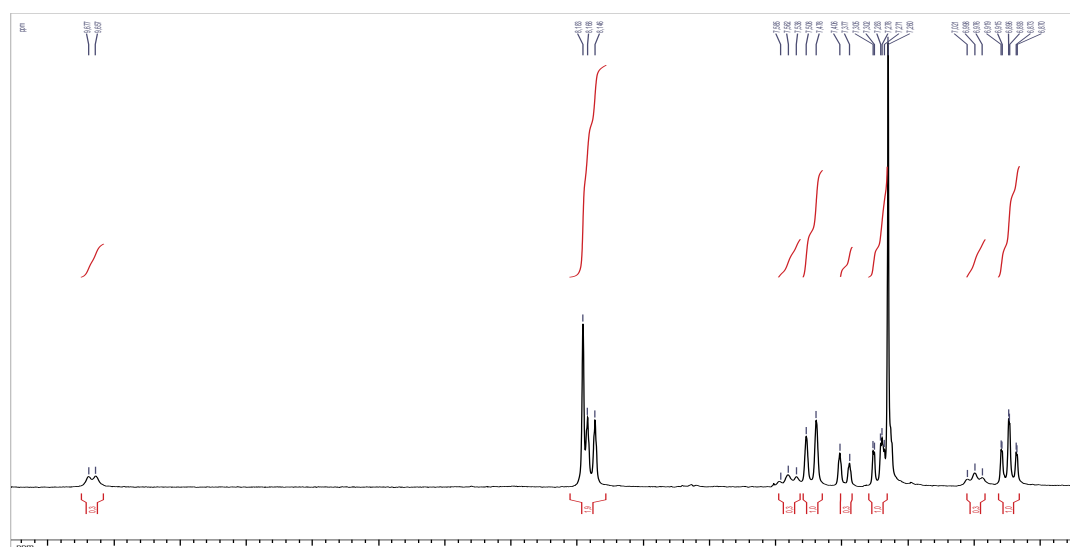


Figure III- 3 : Spectre RMN ¹H du dérivé **3** (CDCl₃, 300 MHz)
(Seule la région des protons aromatiques est représentée)

De plus, une analyse ^1H - ^1H NOESY du composé **3** met en évidence une corrélation entre le doublet à 8,18 ppm (proton H5) et le singlet à 8,16 ppm, ce qui confirme que le composé majoritaire est bien le composé **3** attendu.

En ce qui concerne le composé minoritaire, le spectre RMN ^1H indique l'absence de singlet qui correspondrait à un proton imidazolique. De plus, un déblindage très important du signal du proton H-5 est observé (9,66 ppm). Ce comportement est caractéristique de la présence d'un groupement acyle en position 3 du cycle IP, comme rapporté par C. Jaramillo et *al.*²⁸⁷ Ce fort déblindage du proton H-5 a également été observé, suite à l'acylation de la position 3 de l'IP par des dérivés d'acides aminés.²⁸⁰ Le composé secondaire est donc le dérivé **3''**. Les deux composés n'ont pas pu être séparés à ce stade ; le mélange est donc engagé dans la réaction suivante.

La 2-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridine **4** est obtenu après traitement du mélange précédent, avec une solution aqueuse de soude 5M. Il est à noter que le composé 2-amino-IP **4** est relativement instable à température ambiante, comme cela a été déjà rapporté.²⁵¹ Il est donc immédiatement engagé dans l'étape suivante, qui consiste en une acylation régiosélective de la position 3 du cycle IP.

II.2. Synthèse des dérivés C-3 acylés **6**

L'étape clé de la synthèse des pyrido-imidazo[1,3]diazépinones est l'obtention des intermédiaires diamines C-3-acyl-IP **6**. Pour ce faire, il faut réaliser une acylation de Friedel-Crafts régiosélective en position 3 du cycle IP, selon l'approche mise au point dans notre laboratoire. Cette approche tire profit de la réactivité de la position 3 de l'IP, position la plus riche en électrons de l'hétérocycle. La nucléophilie de cette position est renforcée par la présence de la fonction amine en position 2. La position 3 est alors capable d'attaquer la fonction acide carboxylique activée d'un acide aminé, selon une réactivité de type « ène-amine », comme décrit dans la partie II de ce manuscrit (Section III-3, page 112). 16 acides aminés différents ont été utilisés pour obtenir les dérivés C-3-acyles-IP **5a-r** avec des rendements allant de 28 à 97%, après purification par chromatographie sur alumine. Quelque soit l'acide aminé utilisé, seul le dérivé C-3 acylé est isolé, le dérivé N-acylé en position 2 n'étant détecté qu'à l'état de traces lors de l'analyse LC-MS du brut réactionnel.

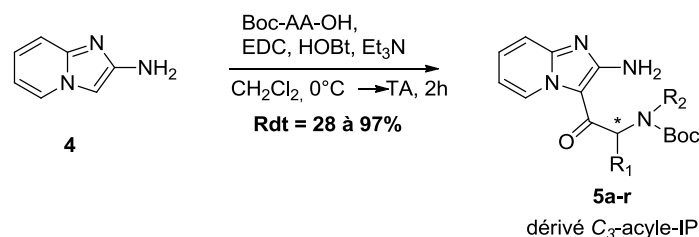
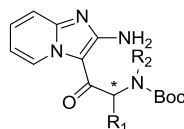


Schéma III- 5 : Acylation de Friedel-Crafts régiosélective de la 2-amino-IP
(Cf. partie II du manuscrit, section III-3)



Composé	R ₁	R ₂	Rdt (%)
5a	(S)-CH ₂ Ph	H	88
5b	(S)-CH ₃	H	93
5c	(S)-CH(CH ₃) ₂	H	72
5d	(S)-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	71
5e	(2S, 3S)-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H	86
5f	(S)-CH ₂ CH ₂ SMe	H	69
5g	(S)-CH ₂ CO ₂ Bn	H	93
5h	(S, S)-CH(CH ₃)OBn	H	65
5i	(S)-(CH ₂) ₄ NHCbz	H	97
5j	(S)-CH ₂ -indole	H	64
5k	"Proline" R ₁ , R ₂ = [(CH ₂) ₃] _c		88
5l	(2S, 3R)-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃		89
5m	(R)-CH ₂ Ph	H	89
5n	(S)-CH ₂ OBn	H	28
5o	(S)-CH ₂ -(1-naphtyl)	H	64
5p	(S)-CH ₂ Ph	Me	67
5q	(S)-CH ₂ -pC ₆ H ₄ OBn	H	53
5r	(S)-C ₆ H ₅	H	40

Tableau III- 2 : Intermédiaires C-3-acyles-IP

Pour accéder aux intermédiaires clés diamines, il est nécessaire d'ôter le groupement protecteur "Boc". Dans la plupart des cas (dérivés **5a-g**, **5i-m**, **5o-5p** et **5r**), le traitement du dérivé **5** par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 37%, et la neutralisation subséquente des sels chlorhydriques formés, permettent d'isoler l'intermédiaire diamine **6** correspondant (Schéma III- 6 et Tableau III- 3).

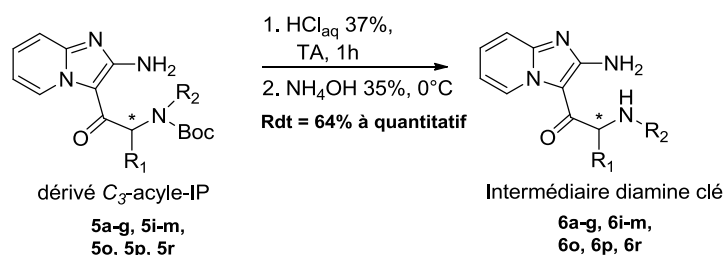


Schéma III- 6 : Conditions générales d'obtention de l'intermédiaire diamine **6**

L'objectif à ce stade, réside dans une déprotection orthogonale du groupement "Boc", sans entraîner la perte de la protection (OBn) de la chaîne latérale.

Dans le cas des dérivés **5h**, **5n** et **5q**, deux fonctions acido-sensibles sont présentes et peuvent être potentiellement touchées lors de la déprotection. Pour les dérivés **5h**, **5n**, nous n'avons pas eu de difficultés à ôter sélectivement le groupement "Boc" dans nos conditions habituelles de déprotection. En revanche, pour le dérivé **5q**, l'utilisation d'une solution d'acide chlorhydrique à 37% élimine le groupe protecteur "Boc" mais entraîne aussi, une déprotection partielle du groupement *O*-benzyle. En effet, l'analyse LC-MS révèle la présence du produit désiré de masse molaire 386 (rapport masse sur charge $m/z = 387,3$), et d'un composé dont la masse correspond à celle du produit attendu ayant perdu 90 unités ($m/z = 297,2$).

Pour éviter la perte du groupement *O*-benzyle, une solution d'acide trifluoroacétique à 20% dans le dichlorométhane a été utilisée. Dans ces conditions, seul le groupement "Boc" est éliminé. Après un traitement avec une solution basique (solution aqueuse de bicarbonate de sodium), le composé **6q** est isolé sous la forme d'une base avec un rendement de 86% (Schéma III- 7).

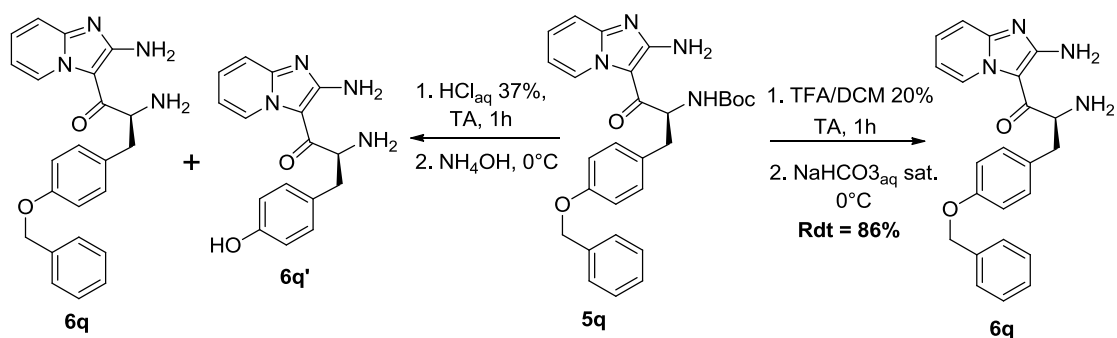
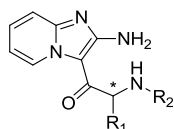


Schéma III- 7 : Déprotection du groupement "Boc" du composé **5q**



Composé	R ₁	R ₂	Rdt (%)
6a	(S)-CH ₂ Ph	H	98
6b	(S)-CH ₃	H	92
6c	(S)-CH(CH ₃) ₂	H	99
6d	(S)-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	88
6e	(2S, 3S)-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H	99
6f	(S)-CH ₂ CH ₂ SMc	H	98
6g	(S)-CH ₂ CO ₂ Bn	H	78
6h	(S, S)-CH(CH ₃)OBn	H	91
6i	(S)-(CH ₂) ₄ NHCbz	H	98
6j	(S)-CH ₂ indole	H	61
6k	R ₁ , R ₂ = [(CH ₂) ₃] _c		82
6l	(2S, 3R)-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H	94
6m	(R)-CH ₂ Ph	H	88
6n	(S)-CH ₂ OBn	H	85
6o	(S)-CH ₂ (1-naphtyl)	H	98
6p	(S)-CH ₂ Ph	Me	99
6q	(S)-CH ₂ -pC ₆ H ₄ OBn	H	86
6r	(S)-C ₆ H ₅	H	99

Tableau III- 3 : Intermédiaires clés diamines

L'intermédiaire clé "diamine" une fois obtenu, peut être engagé dans différentes voies de synthèse pour accéder aux séries 1, 2 et 3 évoquées plus haut. Pour l'étude de chacune de ces séries, nous décrirons la stratégie d'obtention des composés, puis nous présenterons les résultats des tests d'inhibition enzymatique.

II.3. Étude de la série 1 : dérivés "urée"

Le composé JMV4967 possède un groupement aromatique en position 2 du cycle diazépique. Afin de déterminer son importance pour l'inhibition enzymatique, la synthèse des dérivés "urée" a été envisagée dans un premier temps. De plus, le groupement urée possède l'avantage d'être à la fois donneur de liaison hydrogène (NH), et accepteur de liaison hydrogène (CO); ce qui permet potentiellement l'établissement de liaisons hydrogène supplémentaires entre l'inhibiteur et la cible.

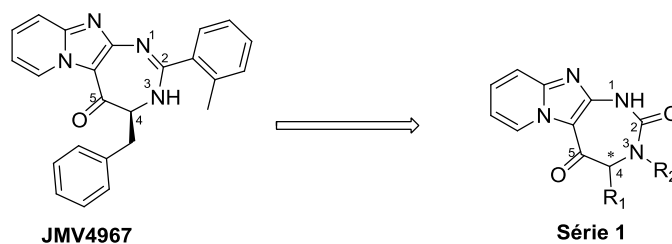


Schéma III- 8

Les dérivés "urée" ou pyrido-imidazodiazépine-2,5-diones **7** sont obtenus par carbonylation intramoléculaire, à partir des intermédiaires diamines **6**. Les conditions opératoires ont été tout d'abord mises au point.

II.3.1. Étude de la cyclisation

Les premiers essais de cyclisation ont été effectués à température ambiante, en utilisant l'intermédiaire diamine ayant un groupe benzyle ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$) en R_1 (composé **6a**). Le 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) a été utilisé comme agent de carbonylation, et l'acétonitrile comme solvant de réaction. Dans ces conditions expérimentales, le composé **7a** est obtenu avec un rendement de 64%. Cependant, l'analyse LC-MS du brut révèle la présence d'un second composé, qui pourrait correspondre à l'intermédiaire réactionnel **8**. En effet, le spectre de masse montre un ion moléculaire de rapport masse sur charge (m/z) 375, correspondant à l'ajout d'un groupement imidazolylcarbonyle au composé **6a**.

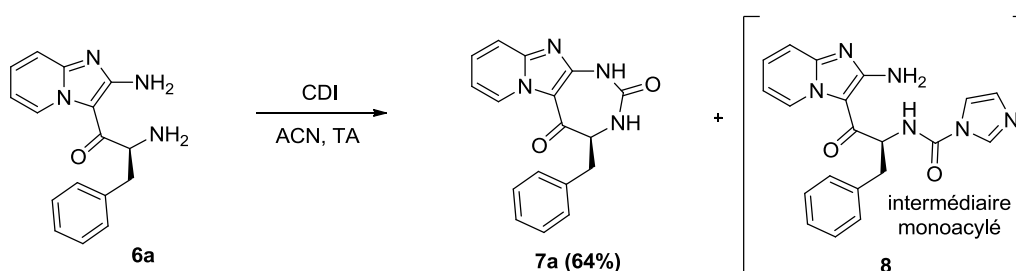


Schéma III- 9 : Carbonylation intramoléculaire à température ambiante

Les tentatives pour isoler cet intermédiaire ne furent pas concluantes. En vue d'identifier la position de carbonylation, le composé **6a** a été mis en présence de CDI dans l'acétonitrile. Après 2 heures de réaction, un équivalent de benzylamine est ajouté au milieu réactionnel, afin de piéger l'intermédiaire monoacylé sous forme d'une urée non cyclique **9**. Le composé **9** a pu être isolé avec un rendement de 34%, après purification par colonne chromatographique sur gel d'alumine. Une expérience RMN HMBC ^1H - ^{13}C du composé **9** a permis de mettre en évidence une corrélation 3J , entre le signal à 158,9 ppm du carbonyle de l'urée, et le signal à 5,20 ppm du proton porté par le carbone alpha du résidu phénylalanine (Figure III- 4). Ce résultat prouve sans ambiguïté, que le groupement amine aliphatique est celui qui est préalablement activé. Ainsi, l'amine exocyclique du noyau IP reste modérément réactive comme cela a pu être observé lors de la réaction d'acylation de Friedel-Crafts.

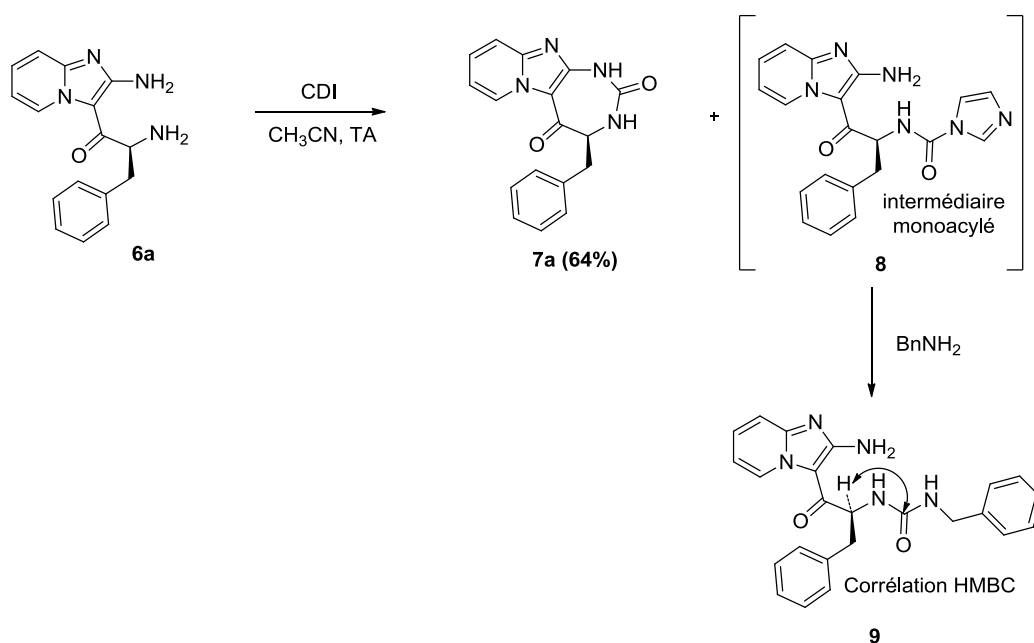


Schéma III- 10 : Détermination de la position de *N*-activation.

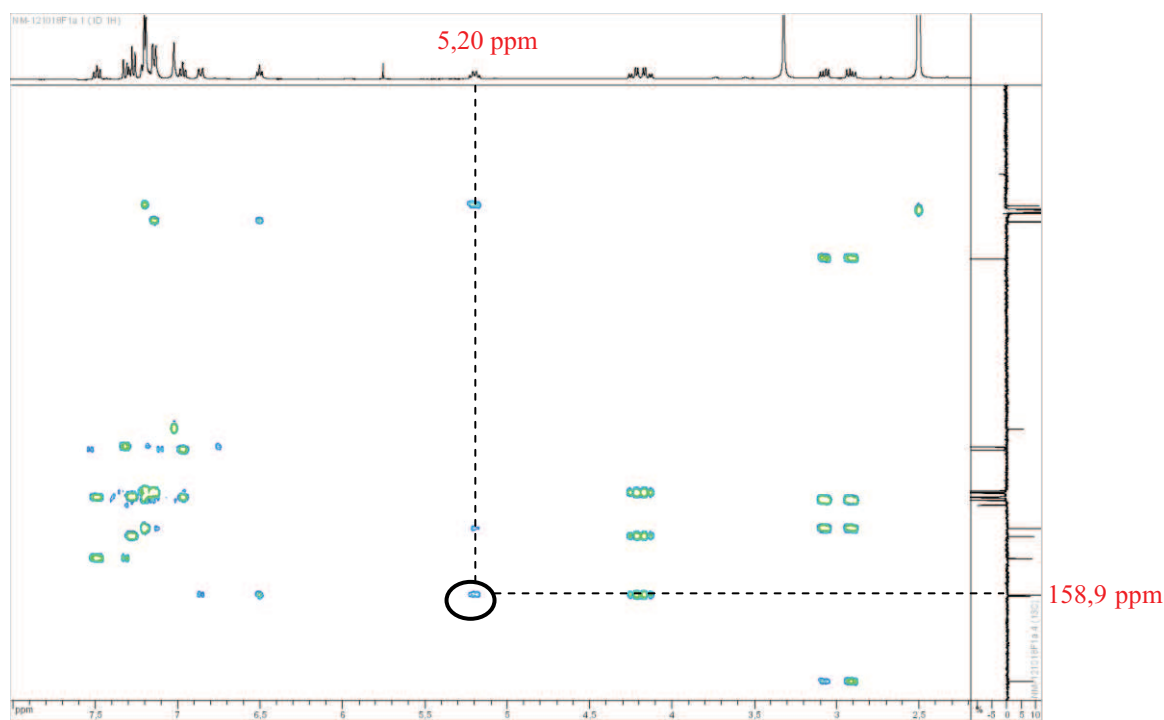


Figure III- 4 : Spectre RMN ^1H - ^{13}C HMBC du composé **9** dans le CDCl_3

Pour optimiser les conditions de cyclisation, le composé **6a** a été mis en réaction avec le CDI dans l'acétonitrile, et le mélange est chauffé à 60°C pendant 2h. Dans ces conditions, la totalité du composé **6a** est consommée, et seul le composé **7a** est formé. Celui-ci précipite

dans le milieu réactionnel à température ambiante ; il est isolé après filtration et lavage à l'éther diéthylique, avec un rendement de 78% (Schéma III- 11).

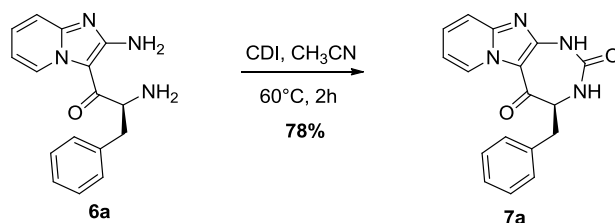
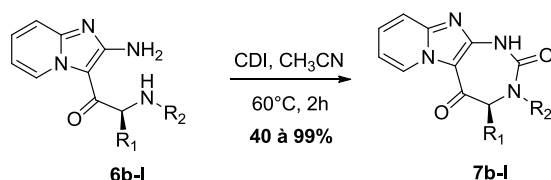


Schéma III- 11 : Optimisation de la carbonylation intramoléculaire

Une fois les conditions réactionnelles optimisées, nous avons étendu la réaction à d'autres 2-amino-3-acyle-IP. Ainsi, les intermédiaires **6b-l** décrits précédemment (Cf. partie III, chap. II.2.), ont pu être convertis quantitativement et une librairie de dérivés "urée" **7b-l** a été synthétisée. Les composés ont été isolés par simple filtration et les rendements varient entre 40 et 99%. Tous les composés de cette série sont répertoriés dans le Schéma III- 12 et Tableau III- 4.

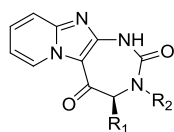


Composé	R ₁	R ₂	Rdt (%)
7a	(<i>S</i>)-CH ₂ Ph	H	78
7b	(<i>S</i>)-CH ₃	H	93
7c	(<i>S</i>)-CH(CH ₃) ₂	H	60
7d	(<i>S</i>)-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	86
7e	(<i>S, S</i>)-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H	60
7f	(<i>S</i>)-CH ₂ CH ₂ SMe	H	68
7g	(<i>S</i>)-CH ₂ CO ₂ Bn	H	62
7h	(<i>S, S</i>)-CH(CH ₃)OBn	H	40
7i	(<i>S</i>)-(CH ₂) ₄ NHCbz	H	56
7j	(<i>S</i>)-CH ₂ -indole	H	89
7k	R ₁ , R ₂ = [(CH ₂) ₃] _c		99
7l	(<i>S, R</i>)-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H	60

Schéma III- 12 et Tableau III- 4 : Composés de la série "urée"

II.3.2. Étude de l'activité enzymatique

Nous avons ensuite procédé à l'évaluation de l'effet inhibiteur des composés de cette série sur la KLK7, et sur trois autres protéases cibles (KLK5, 8 et 14) afin d'évaluer leur sélectivité. Aucune action inhibitrice significative n'a été notée pour ces composés sur les quatre protéases testées (inhibition < 20%). Un composé est considéré comme ayant un effet inhibiteur s'il entraîne une inhibition d'au moins 30% de l'activité enzymatique. Les pourcentages d'inhibition pour la KLK7, déterminés pour des concentrations de 50 μ M, sont répertoriés dans le Tableau III- 5.



Composé	R ₁	R ₂	% d'inhibition de KLK7
7a	(<i>S</i>)-CH ₂ Ph	H	< 2%
7b	(<i>S</i>)-CH ₃	H	< 2%
7c	(<i>S</i>)-CH(CH ₃) ₂	H	< 2%
7d	(<i>S</i>)-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	< 2%
7e	(<i>S, S</i>)-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H	< 2%
7f	(<i>S</i>)-CH ₂ CH ₂ SMe	H	< 2%
7g	(<i>S</i>)-CH ₂ CO ₂ Bn	H	< 2%
7h	(<i>S, S</i>)-CH(CH ₃)OBn	H	< 2%
7i	(<i>S</i>)-(CH ₂) ₄ NHCbz	H	< 2%
7j	(<i>S</i>)-CH ₂ -indole	H	10%
7k	R ₁ , R ₂ = [(CH ₂) ₃] _c		< 2%
7l	(<i>S, R</i>)-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H	< 2%

Tableau III- 5 : Pourcentage d'inhibition de la KLK7 à 50 μ M par les dérivés "urée"

Dans cette série, aucune molécule n'a montré une inhibition significative de la KLK7. Exception faite du composé **7j** qui a montré une inhibition de 10% à l'égard de cette enzyme, nous avons noté un pourcentage d'inhibition inférieur à 2% pour les autres composés.

➤ Conclusion

A partir des composés 2-amino-3-acyle-IP, nous avons synthétisé une librairie de 12 dérivés pyrido-imidazodiazépine-2,5-diones, avec des rendements variant entre 40 et 99%.

L'activité inhibitrice de ces composés a été évaluée à l'égard de 4 protéases à sérine dont KLK7, mais aucune molécule n'a montré une inhibition significative. Ces résultats semblent indiquer, d'une part, que le noyau aromatique présent en position 2 du cycle diazépinique dans le hit initial JMV4967, joue un rôle dans l'inhibition enzymatique. D'autre part, un groupe carbonyle en position 2 du cycle diazépinique, et un NH en position 1, ne permettent pas d'établir des liaisons hydrogène entre l'inhibiteur et la protéase. Néanmoins, ce travail a été valorisé, en termes de méthodologie, par une publication parue dans le journal *Tetrahedron Letters*, **54**, 1364-1367 (2013).

Les dérivés de la série "urée" n'ayant pas permis d'améliorer le pouvoir inhibiteur à l'égard de la KLK7, le développement d'une deuxième série de composés analogues du JMV4967, a été envisagé.

II.4. Étude de la série 2 : analogues du JMV4967 diversement fonctionnalisés

Les composés de cette série sont issus de la modulation des sommets 2, 3, 4 et 5 du JMV4967.

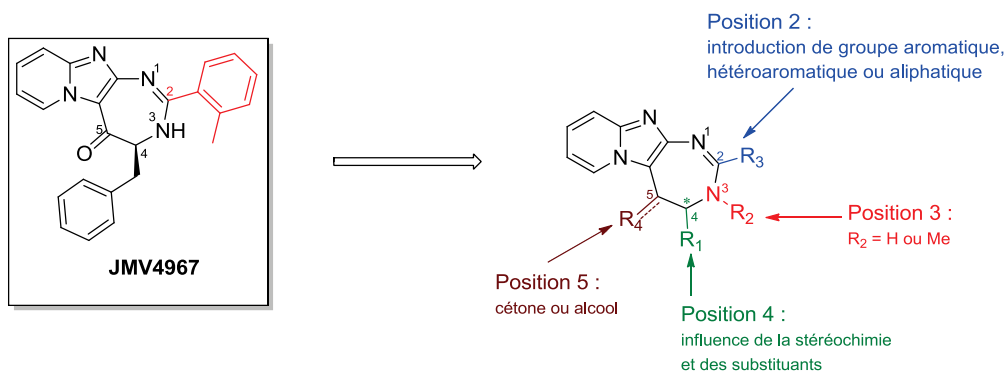


Schéma III- 13 : Modulations du cycle diazépinique du JMV4967 étudiées

Puisque le hit initial JMV4967 possède un centre chiral, l'influence de la stéréochimie a tout d'abord été explorée. L'énantiomère (*R*) du JMV4967 (composé **10**) a été synthétisé, afin d'évaluer son pouvoir inhibiteur vis-à-vis de la KLK7.

➤ Synthèse et évaluation de l'effet inhibiteur de l'énantiomère du JMV4967

La synthèse du composé **10** est effectuée à partir de la diamine **6m**, par condensation avec le tolualdéhyde à reflux du chloroforme. Après refroidissement, l'intermédiaire aminal obtenu est oxydé *in situ* à l'aide d'un mélange de tétraacétate de plomb et d'iode. A la fin de

la réaction, le milieu réactionnel est lavé successivement avec une solution aqueuse de thiosulfate de sodium 10% (m/v) pour réduire l'excès d'iode et une solution aqueuse saturée d'hydrogencarbonate de sodium. Après séchage sur sulfate de sodium anhydre, filtration et condensation sous pression réduite, le composé **10** est isolé par purification sur une colonne chromatographique de gel d'alumine.

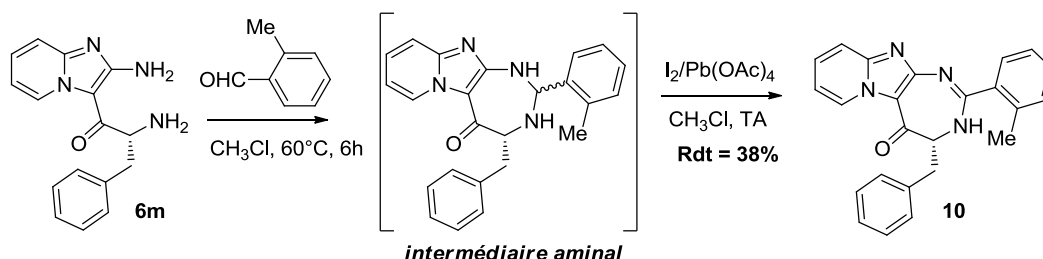


Schéma III- 14 : Synthèse de l'énantiomère du composé JMV4967

Le composé **10** a fait l'objet d'un test d'inhibition enzymatique, et les résultats montrent qu'il a un faible effet inhibiteur sur la KLK7 ($IC_{50} = 95,9 \pm 1,7 \mu M$) comparé au JMV4967 qui a un effet inhibiteur modéré ($IC_{50} = 57,0 \pm 1,0 \mu M$). Ces résultats semblent indiquer que la configuration (*S*) est importante dans cette série de composés pour conserver une activité inhibitrice. Compte tenu de cette observation, les autres modulations ont été effectuées en conservant la configuration (*S*).

Les modifications apportées au sommet 2 du cycle diazépinique seront tout d'abord décrites.

II.4.1. Étude de la position 2

Des premiers travaux menés au laboratoire, il ressort que les composés qui présentent un intérêt dans l'inhibition de la KLK7, sont ceux qui possèdent un noyau aromatique sur le sommet 2 du cycle diazépinique. D'autre part, les substituants les plus intéressants sur ce noyau sont des groupes méthoxy et méthyle. C'est donc en toute logique que nous avons été amenés à synthétiser, dans un premier temps, des composés portant au sommet 2 des noyaux aromatiques diversement substitués par un groupe méthoxy ou méthyle. En parallèle, nous avons envisagé d'introduire des résidus phényle, benzyle ou phénytyle pour étudier l'influence de la longueur du bras espaceur sur cette position du cycle diazépinique. Nous avons également envisagé d'introduire des hétérocycles en vue d'étudier l'influence de la nature du noyau aromatique.

II.4.1.1. Obtention des composés

La synthèse consiste à engager les dérivés *C3*-acyles-IP **6** dans une réaction tandem de condensation avec des aldéhydes, et d'oxydation avec une solution d'iode et de tétraacétate de plomb dans du chloroforme comme décrit précédemment (*Cf.* synthèse de l'énantiomère du JMV4967, page précédente). Pour l'étude de la position 2, nous avons décidé de conserver le groupe benzyle en position 4 du cycle diazépinique, possédant une stéréochimie (*S*). Pour ce faire, les composés cibles ont été synthétisés à partir de l'intermédiaire diamine **6a**, en utilisant les aldéhydes commerciaux convenables. Une série d'aldéhydes aliphatiques, aromatiques ou hétéro-aromatiques a ainsi été sélectionnée. Cela a permis d'accéder à des dérivés portant au sommet 2, un groupe alkyle ou des noyaux (hétéro)aromatiques substitués ou non par des groupes halogéno, méthoxy ou méthyle. Les résultats sont rapportés dans le Tableau III- 6.

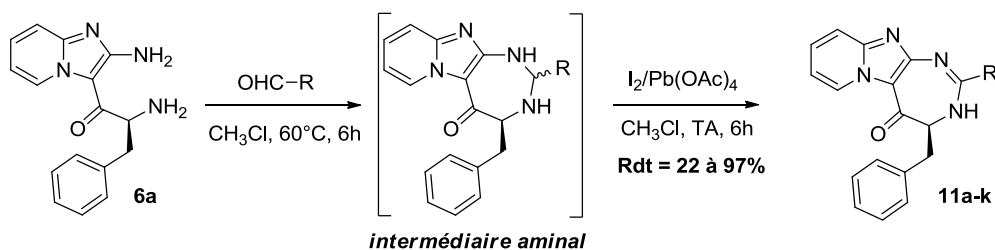
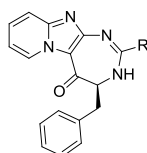


Schéma III- 15 : Introduction de groupes aliphatiques ou hétéroaromatiques en position 2



Composé	R	Rdt (%)
11a	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	22
11b	Ph	53
11c	<i>p</i> -NO ₂ C ₆ H ₄	77
11d	<i>p</i> -BrC ₆ H ₄	82
11e	3-pyridinyle	85
11f	2,4-diMeC ₆ H ₃	65
11g	<i>o</i> -OMeC ₆ H ₄	72
11h	<i>m</i> -OMeC ₆ H ₄	94
11i	2,5-diOMeC ₆ H ₃	97
11j	3,4-diOMeC ₆ H ₃	77
11k	3,4,5-triOMeC ₆ H ₂	59

Tableau III- 6 : Analogues du JMV4967 issus de la modulation du sommet 2

Des dérivés phénoliques et polyphénoliques ont été également synthétisés. Chimiquement, il est possible d'accéder à ces composés à partir de leurs analogues méthoxy

par simple déméthylation. Les composés **12a-d** ont ainsi pu être isolés avec des rendements allant de 24 à 81%, par traitement des dérivés **11g-i** et **11k** avec une solution molaire de tribromure de bore (BBr_3) dans du dichlorométhane (Schéma III- 16).

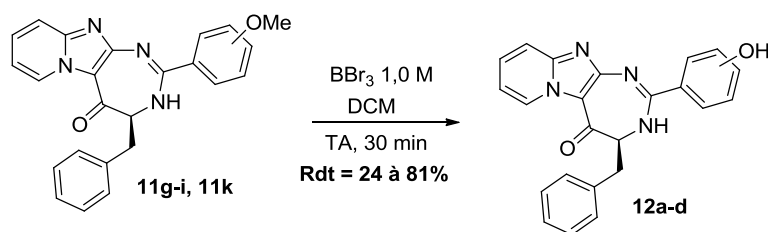
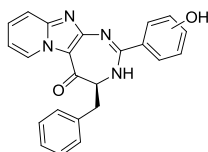


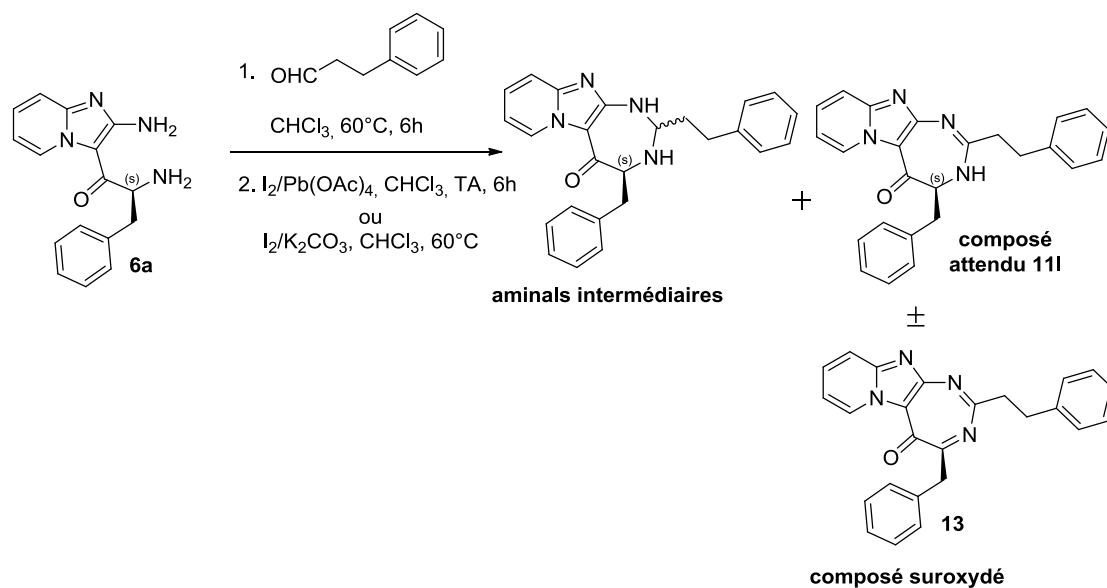
Schéma III- 16 : Synthèse des dérivés (poly)phénoliques



Composé	R	Rdt (%)
12a	<i>o</i> -HO-C ₆ H ₄	81
12b	<i>m</i> -HO-C ₆ H ₄	45
12c	2,5- diHO-C ₆ H ₃	79
12d	3,4,5-triHO-C ₆ H ₂	24

Tableau III- 7 : Dérivés (poly)phénoliques obtenus

Pour étudier l'influence de la longueur du bras espaceur au sommet 2 sur l'activité inhibitrice, l'introduction d'un bras carboné à $n=1$ ou $n=2$ carbones, entre le noyau aromatique et le noyau diazépine (groupes benzyle et phénétyle), a été envisagée. Ainsi, la condensation de la diamine **6a** a été étudiée avec le phénylacétaldéhyde et l'hydrocinnamal-déhyde. Malheureusement, les essais avec ces deux aldéhydes n'ont pas permis d'isoler les composés désirés à l'état pur. Par exemple, la cyclisation de la diamine **6a** et l'hydrocinnamaldéhyde conduit bien à la conversion totale du composé diamine **6a** (déterminé par suivi CCM). Cependant, lors de l'étape d'oxydation, la disparition des aminaux intermédiaires et la formation du dérivé **11l** s'accompagnent d'un composé possédant une masse $[\text{M}+\text{H}]^+$ de 393, pouvant correspondre à un produit de suroxydation du cycle diazépinique (composé **13**). Un allongement du temps de réaction ou l'utilisation d'un autre système oxydant ($\text{I}_2/\text{K}_2\text{CO}_3$ à chaud) ne permet pas de supprimer le composé **6a**, et conduit à une augmentation de la proportion en dérivé suroxydé **13**.



Les différentes tentatives de purification chromatographiques (soit en phase normale, soit en phase inverse) n'ont pas permis d'isoler le composé **11I** à l'état pur, le composé **11I** se dégradant au cours des purifications successives.

Même si les dérivés alkyles semblent difficiles à obtenir, une série de composés 1,3-diazépiniques possédant un noyau aromatique en 2 ont pu être synthétisés. Ces composés, issus de la modulation du sommet 2, ont ensuite été évalués quant à leur capacité à inhiber la KLK7. Ils ont également été testés sur les KLK5, 8 et 14 pour déterminer leur sélectivité.

II.4.1.2. Étude de l'activité enzymatique

Le pouvoir inhibiteur des composés et le mécanisme d'inhibition de l'activité enzymatique ont été ensuite déterminés.

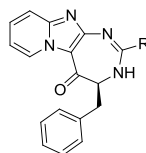
➤ Quantification des effets inhibiteurs

Un premier criblage des composés a été effectué, à 50 μ M, sur les KLK 5, 7, 8 et 14. A l'issue de ce criblage, les activités des KLK 5, 8 et 14 ont été très peu affectées (inhibition < 30%). Nous pouvons donc considérer que ces composés sont dépourvus d'activité envers ces kallikréines.

Les meilleurs résultats d'inhibition ont été obtenus vis-à-vis de la kallikréine 7. Le pouvoir inhibiteur des composés sur cette enzyme, a alors été quantifié par la détermination

des concentrations inhibitrices à 50% (IC₅₀). Les valeurs des IC₅₀ des composés sur la KKK7 sont rapportées dans le Tableau III- 8. La courbe d'inhibition obtenue a permis de calculer l'IC₅₀ selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 \times [I] / (IC_{50} + [I])$$



Composé	R	IC ₅₀ (μM) (KKK7)
11a	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	ni
11b	Ph	ni
11c	<i>p</i> -NO ₂ C ₆ H ₄	ni
11d	<i>p</i> -BrC ₆ H ₄	ni
11e	3-pyridinyle	ni
11f	2,4-diMeC ₆ H ₃	83,9 ± 1,7
11g	<i>o</i> -MeOC ₆ H ₄	98,9 ± 10,2
11h	<i>m</i> -MeOC ₆ H ₄	ni
11i	2,5-diMeOC ₆ H ₃	80,9 ± 2,5
11j (JMV5046)	3,4-diMeOC₆H₃	33,5 ± 1,5
11k	3,4,5-triMeOC₆H₂	55,7 ± 2,3
12a	<i>o</i> -HO-C ₆ H ₄	ni
12b	<i>m</i> -HO-C ₆ H ₄	124,8 ± 1,4
12c	2,5- diHO-C ₆ H ₃	ni
12d	3,4,5-triHO-C ₆ H ₂	ni

Tableau III- 8 : IC₅₀ sur la KKK7 des composés **11a-k** et **12a-b** après 15 minutes d'incubation à 37°C et à pH 8,0
ni = non inhibition [IC₅₀>200 μM (<30% inhibition à 50 μM)]

Les meilleurs inhibiteurs sont les composés **11j** et **11k** qui possèdent des IC₅₀ de 33,5 ± 1,5 μM et 55,7 ± 2,3 μM respectivement. Le remplacement du noyau aromatique par un substituant aliphatique (composé **11a**) entraîne une perte d'inhibition. L'introduction d'un groupe phényle ou 3-pyridinyle supprime aussi l'action inhibitrice (composés **11b** et **11e**).

L'introduction d'un groupement électroattracteur en position *para* du noyau phényle (composé **11c** et **11d**) est également préjudiciable à l'activité. Lors du premier criblage, il a été observé que le pouvoir inhibiteur est conservé lorsqu'un groupe *para*-méthoxy- ou *para*-méthylphényle est présent sur le sommet 2 du cycle diazépique (Cf. Tableau III-1, composés JMV4912 et JMV4968), bien que l'activité reste plus faible que celle du JMV4967 (IC₅₀ 70 μM). Cette observation nous a conduits à explorer des composés portant en position 2 du cycle diazépine, des groupes méthylphényle ou méthoxyphényle. Dans la série « méthyle », le dérivé portant un groupe 2,4-diméthylphényle (composé **11f**) a montré une faible inhibition comparée aux dérivés monométhyles correspondants (JMV4967 et JMV4968). Dans la série

« méthoxy », le dérivé *meta*-méthoxyphényle (composé **11h**) s'est révélé inactif. Une certaine inhibition a été notée pour les dérivés *ortho*-méthoxy-, 2,5-diméthoxy- et 3,4,5-triméthoxyphényle (composés **11g**, **11i** et **11k**). Le meilleur résultat a été obtenu avec le dérivé 3,4-diméthoxyphényle **11j**, qui a montré le plus grand pouvoir inhibiteur ($IC_{50} = 33,5 \mu M$).

Contrairement aux dérivés méthoxy qui montrent une certaine capacité inhibitrice, les dérivés (poly)phénoliques correspondants étaient totalement inactifs (composés **12a-d**). Ces résultats suggèrent qu'un ou plusieurs groupes méthoxy pourraient participer, en tant qu'accepteur de liaisons hydrogène, à l'interaction du composé dans le site actif de la KLK7.

La courbe d'inhibition de la KLK7 par le meilleur inhibiteur de cette série, le composé **11j** que nous désignerons **JMV5046** pour la suite, est représentée dans la Figure III- 5.

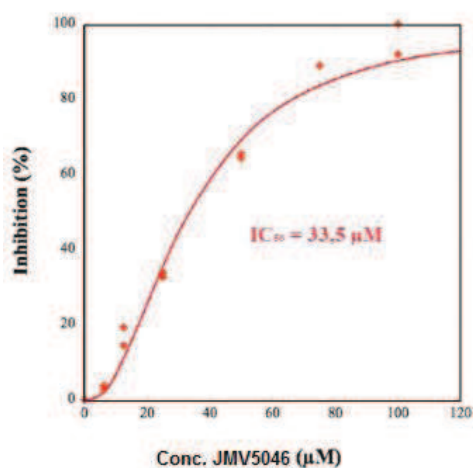


Figure III- 5 : Courbe IC_{50} de la KLK7 par le JMV5046

Le JMV5046 a alors fait l'objet d'études biochimiques plus approfondies, afin de déterminer son mécanisme d'action.

➤ **Détermination du mécanisme d'inhibition**

Tout d'abord, nous avons cherché à savoir si l'inhibition observée était réversible ou non. Pour ce faire, la méthode de dilution qui consiste à diluer fortement le complexe enzyme-inhibiteur (par un facteur 40 par exemple) a été utilisée. La concentration de l'inhibiteur est choisie de manière que l'enzyme soit inhibée à plus de 50% avant dilution, et à moins de 5% après dilution. Ainsi, une haute dilution du complexe KLK7-JMV5046 a permis de restituer

plus de 90% de l'activité enzymatique initiale (Figure III- 6). Ce résultat est en accord avec le comportement d'un inhibiteur réversible.

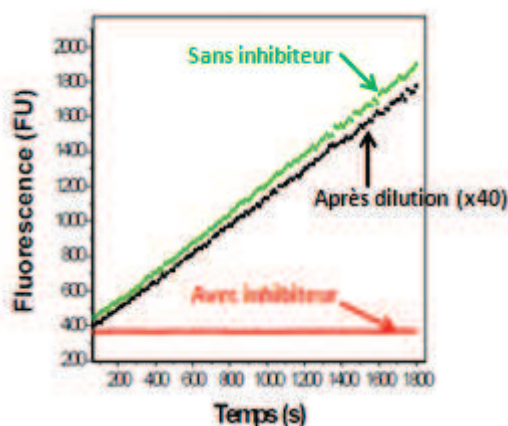


Figure III- 6 : Réversibilité de l'inhibition de la KLK7 par le JMV5046

En Vert : activité de la KLK7 en absence d'inhibiteur ; en rouge : activité de la KLK7 mesurée après 15 minutes d'incubation avec le JMV5046 ; en noir : activité de la KLK7 restituée à plus de 90% après dilution du complexe KLK7-JMV5046.

Ensuite, le caractère compétitif ou non de cette inhibition a été déterminé en étudiant l'évolution de deux paramètres importants en cinétique enzymatique : la vitesse maximale (V_{\max}) de la réaction enzymatique, et la constante de Michaelis-Menten apparente (K_m). Parmi les méthodes graphiques qui existent, celle de Lineweaver et Burk a été utilisée.

La méthode de Lineweaver-Burk est une méthode de représentation graphique de l'inverse de la vitesse de la réaction en fonction de l'inverse de la concentration en substrat selon l'équation suivante :

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{\left\{1 + \frac{[I]}{K_i}\right\} K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

V_{\max} = vitesse maximale de la réaction enzymatique ; $[S]$ = concentration du substrat ;
 K_m = constante de Michaelis-Menten. K_i = constante de dissociation du complexe E.I.

Cette représentation graphique, appelée également « représentation en double-inverses » permet de distinguer un inhibiteur compétitif d'un inhibiteur incompétitif, non compétitif ou mixte. Dans le cas d'une inhibition compétitive, les droites obtenues pour des concentrations croissantes d'inhibiteurs, se croisent en un seul point sur l'axe des ordonnées.

Ainsi, pour le JMV5046, la représentation de Lineweaver-Burk a montré que la vitesse de la réaction enzymatique (V_{\max}) reste inchangée pour des concentrations croissantes

d'inhibiteur, tandis que les valeurs des K_m augmentent. Ceci met en évidence le caractère compétitif de l'inhibiteur JMV5046, vis-à-vis du substrat au niveau du site actif (Figure III- 7A). Une saturation de l'enzyme en substrat permet donc de lever l'effet inhibiteur exercé. Cela est confirmé par la tendance à la hausse des IC_{50} obtenues pour des concentrations croissantes de substrat (Figure III- 7B).

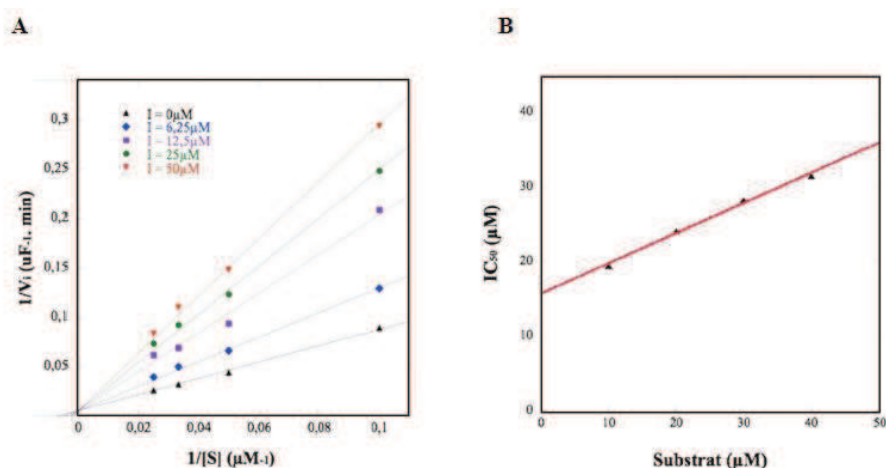


Figure III- 7 : Analyse de la compétitivité du JMV5046 vis-à-vis du substrat au niveau du site actif de la KLK7. **A-** Représentation en double-inverse de Lineweaver-Burk pour des concentrations croissantes d'inhibiteur JMV5046 (0 à 50 μM) et de substrat (Suc-LLVY-AMC : 10 à 40 μM). **B-** Évolution des IC_{50} de JMV5046 en fonction de la concentration en substrat.

La constante d'affinité (K_i) du JMV5046 pour la KLK7 a été également déterminée et nous avons noté une valeur de $K_i = 27 \pm 1,8 \mu M$. L'activité du JMV5046 a été évaluée sur trois autres kallikréines tissulaires humaines (KLK5, KLK8 et KLK14). Aucune inhibition significative n'a été observée à une concentration de 50 μM , faisant alors de ce composé un inhibiteur sélectif de la KLK7.

Molécule	Inhibition % (50 μM)				IC_{50} (μM)
	KLK5	KLK8	KLK14	KLK7	KLK7
JMV5046	15	16	18	70	33,5 ($\pm 1,5$)

Tableau III- 9 : Sélectivité du composé JMV5046 envers la KLK7

En vue de mieux préciser les interactions entre la KLK7 et le JMV5046, une étude de modélisation moléculaire a été effectuée.

➤ Étude des bases structurales de l'inhibition de la KLK7 par le JMV5046

Nous avons réalisé une étude comparative de modélisation moléculaire par docking *in silico* des complexes KLK7-JMV5046 et KLK7-composé **11h** afin de proposer des bases

structurales pour l'inhibition, en utilisant *Molegro Virtual Docker* et la structure PDB 2QXH. Le composé **11h** est l'une des molécules inactives sur la KLK7 ($IC_{50} > 200 \mu M$). C'est un dérivé monométhoxyphényle (position *meta*) contrairement au JMV5046 qui est un dérivé 3,4-diméthoxyphényle. La meilleure pose pour chaque complexe est représentée dans la Figure III- 8.

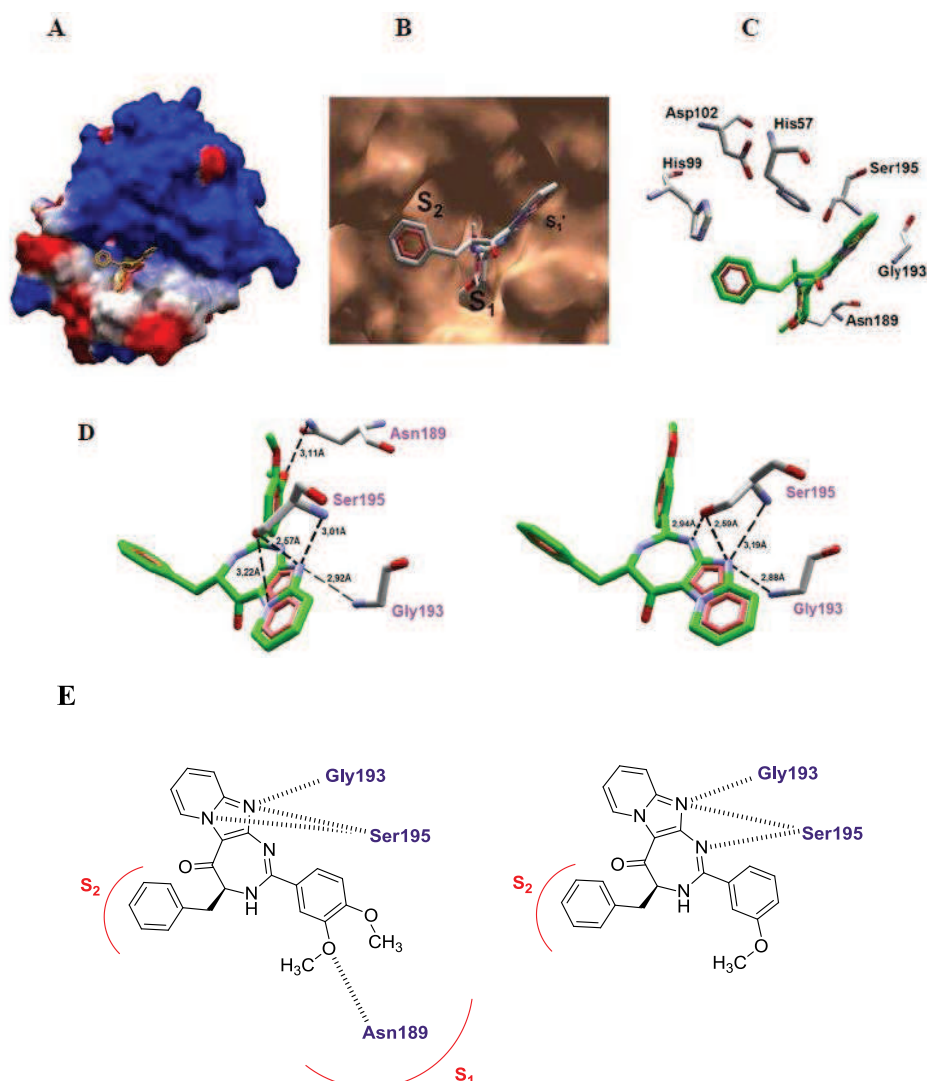


Figure III- 8 : Docking *in silico* des composés JMV5046 et **11h** avec la KLK7

A- Fixation du JMV5046 (bâtonnets jaunes) au sein de la KLK7 (représentation électrostatique de surface). **B-** Vue agrandie du positionnement de JMV5046 (bâtonnets en gris, atomes d'oxygène en rouge, atomes d'azote en bleu) dans les poches S1', S1 et S2. **C-** Résidus proches (bâtonnets, carbones en gris) de JMV5046 (bâtonnets, carbones en vert). **D-** Liaisons hydrogène (pointillés noirs) établis entre les résidus Asn189, Gly193, Ser195 et le JMV5046 (à gauche) et les résidus Gly193, Ser195 et le composé **11h** (à droite). **E-** Schémas des topologies de fixation du JMV5046 (à gauche) et du composé **11h** (à droite) dans les poches du site actif.

Les composés JMV5046 et **11h** occupent le site actif de la KLK7 en positionnant le motif imidazopyridine dans la poche S1', et le cycle diazépnone dans la poche S1 selon la nomenclature de Schechter et Berger (*Cf.* partie I, section I.2.1.). Le groupe benzyle se localise dans la poche S2. On observe que les deux atomes d'azote du motif IP peuvent établir des liaisons hydrogène avec les résidus sérine 195 et glycine 193 du site catalytique de la KLK7 (distance d'environ 3Å). A la différence du composé **11h**, le JMV5046 peut établir une liaison hydrogène supplémentaire entre l'asparagine Asn189 de la poche S1 et l'oxygène de son second groupement méthoxy (distance de 3,1Å). Cette différence d'interaction pourrait expliquer les différences d'inhibition de la KLK7 enregistrées pour ces 2 composés.

➤ Conclusion

La modulation de la position 2 du cycle diazépnone a conduit au développement d'une librairie de 16 composés isolés avec de bons rendements. Toutefois, les tentatives d'introduction de bras espaceurs sur ce sommet ont échoué.

Le remplacement du noyau aromatique par un groupe aliphatique supprime l'activité inhibitrice. Le pouvoir inhibiteur est préservé lorsqu'un groupement méthoxy ou méthyle est présent en *para* du noyau phényle avec une certaine préférence pour le groupe méthoxy. L'étude du sommet 2 a permis la découverte d'un composé, le JMV5046, plus actif que le hit initial (JMV4967).

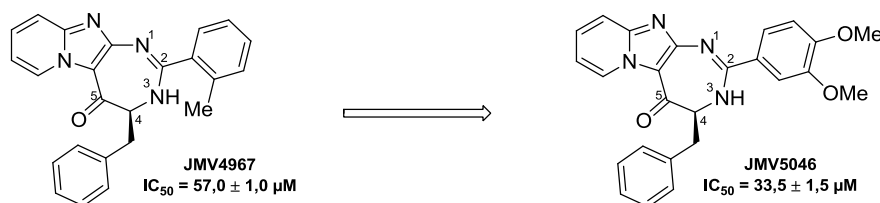


Schéma III- 18 : Optimisation de la position 2 du cycle diazépnone

Tout comme le hit initial, le JMV5046 est un inhibiteur réversible compétitif de la KLK7. D'autre part, ce composé s'est révélé inactif sur d'autres kallicréines humaines (KLK5, KLK8 et KLK14), mettant ainsi en évidence son caractère sélectif à l'égard de la KLK7. Ce résultat encourageant nous a poussés à explorer les autres positions du cycle diazépnone, en maintenant fixe le sommet 2 du cycle (groupe 2-méthylphényle ou 3,4-diméthoxyphényle). L'étude de la position 4 est présentée dans le chapitre suivant.

II.4.2. Étude de la position 4

Les composés JMV4967 et JMV5046 sont des dérivés de la phénylalanine, possédant donc un groupe benzyle en position 4 du cycle diazépinique. Le but de cette étude est de remplacer ce groupe benzyle par des résidus alkyles ou aryles fonctionnalisés ou non.

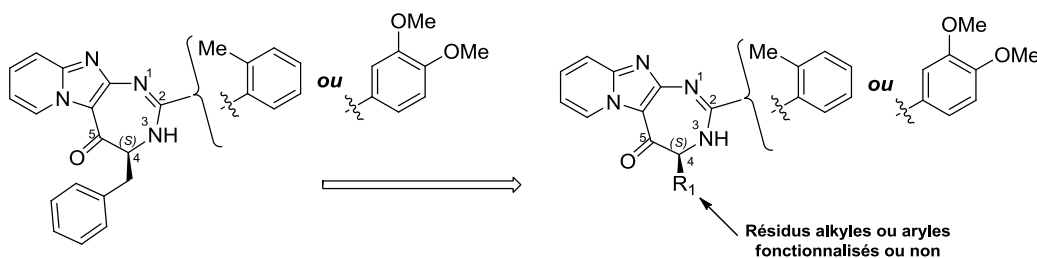


Schéma III- 19 : Modulation de la position 4

Cette modulation devrait permettre d'identifier quel type de substituant est toléré en position 4. Dans un premier temps, la longueur du bras espaceur, reliant le noyau aromatique au cycle diazépine, a été étudiée. Dans un second temps, la suppression du noyau aromatique a été envisagée. Puis, l'influence de l'encombrement stérique a été prise en compte. Enfin, l'introduction d'un résidu 4-hydroxybenzyle à la place d'un benzyle a été réalisée.

II.4.2.1. Synthèse des composés

Contrairement à l'étude de la position 2 où la modulation dépend du choix de l'aldéhyde utilisé lors de la cyclisation de l'intermédiaire, l'introduction d'une diversité en position 4 dépend de l'acide aminé utilisé pour l'étape d'acylation de la 2-amino-IP.

■ Influence de la longueur du bras espaceur

L'étude de l'influence de la longueur du bras espaceur entre le noyau aromatique et le cycle diazépine (Schéma III- 20), nous a conduits à utiliser la phénylglycine (n=0) et la sérine protégée par un groupement benzyle (Boc-Ser(Bn)-OH) comme donneur d'acyle (n=3).

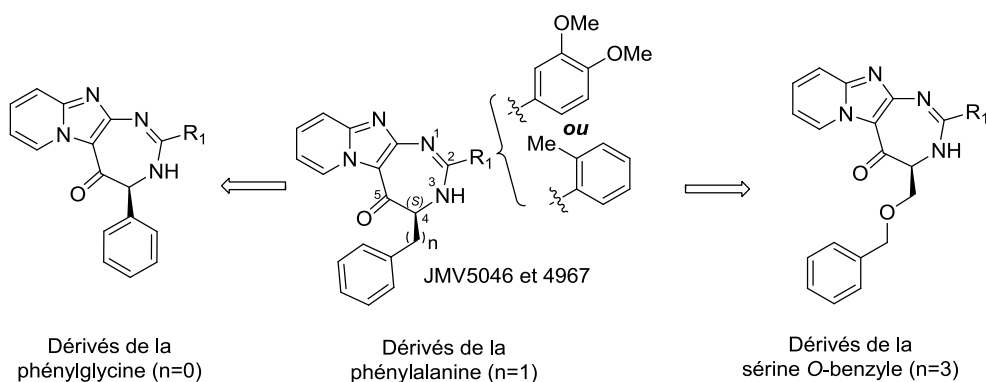


Schéma III- 20 : Étude de la longueur du bras espaceur

Afin d'obtenir ces composés, la 2-amino-IP a été successivement acylée par la Boc-Phénylglycine (n=0, composé **5r**) et par la Boc-sérine protégée sous forme *O*-benzyle (n=3, composé **5n**), comme décrit dans la section II.2. (Partie III du manuscrit). Après déprotection du groupement "Boc" en milieu acide, les diamines correspondantes **6r** et **6n** ont été cyclisées en présence d'*ortho*-tolualdéhyde ou de 3,4-diméthoxybenzaldéhyde, puis oxydées.

Ainsi, à partir du composé **5n**, les dérivés de la sérine (**13a** et **13b**) ont été isolés après purification par chromatographie sur gel d'alumine, avec des rendements de 31 et 47% respectivement.

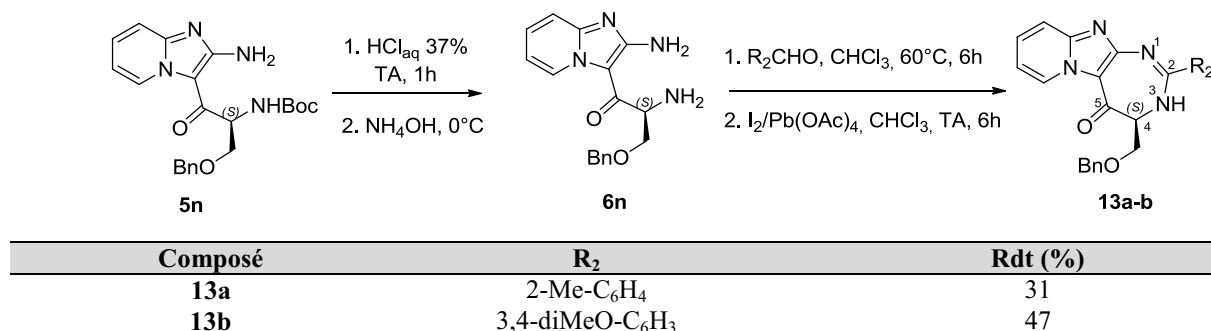


Schéma III- 21 : Synthèse des composés **13a-b**

Dans le cas du composé **6r**, dérivé de la phénylglycine, on observe la formation de deux composés lors de la réaction de cyclisation/oxydation en présence d'*ortho*-tolualdéhyde (Schéma III- 22). En effet, l'analyse LC-MS du brut réactionnel révèle la présence du composé mono-oxydé **13c** désiré et d'un second produit dont la masse correspond à celle du composé di-oxydé **13c'**. Les tentatives pour séparer les deux composés par colonne chromatographique sur gel d'alumine non pas été concluantes. L'utilisation d'un autre agent

oxydant, la 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ), en vue de limiter la suroxydation n'a pas permis d'améliorer le résultat observé.

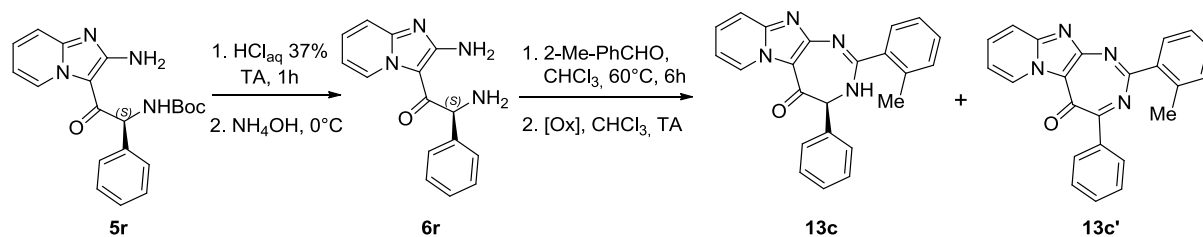


Schéma III- 22 : Essais d'obtention du composé cyclique **13c** avec le dérivé de la Phénylglycine
 $[Ox]$ = Oxydant ($I_2/Pb(OAc)_4$ ou DDQ)

Puisque le produit di-oxydé est détecté en HPLC de façon non négligeable (40%), l'hypothèse, selon laquelle une oxydation plus poussée permettrait d'obtenir uniquement le composé de double oxydation, a été émise. Malheureusement, le produit mono-oxydé **13c** n'a pas pu être converti totalement, même après 72h de réaction, pour obtenir uniquement le composé di-oxydé **13c'**.

Cette différence de réactivité entre les composés portant un substituant benzylique (dérivés de la phénylalanine) et celui portant un résidu phényle en position 4 du cycle diazépinique (dérivé de la phénylglycine) pourrait s'expliquer par une différence de densité électronique en position 4 du cycle diazépinique. En effet, la présence du noyau phényle pourrait augmenter la densité électronique du sommet 4 du cycle diazépinique, facilitant son oxydation et de ce fait l'introduction de l'insaturation au niveau de la liaison $N3-C4$ de la diazépnone.

▪ Suppression du noyau aromatique : le noyau benzyle initialement présent dans le JMV5046 a été remplacé par un groupe méthyle ou hydroxyméthyle.

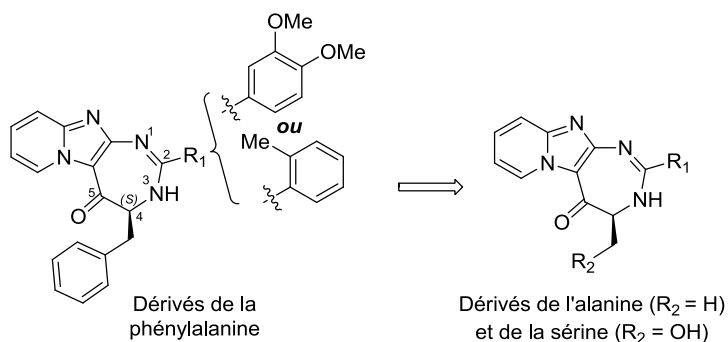


Schéma III- 23 : Étude de la suppression du noyau aromatique

Dans le cas du dérivé méthylé, la 2-amino-IP a été acylée par de la Boc-Ala-OH (composé **5b**). Après déprotection du groupement Boc en milieu acide, la diamine correspondante **6b** a été cyclisée en présence d'*ortho*-tolualdéhyde ou de 3,4-diméthoxybenzaldéhyde, pour fournir, après purification chromatographique, les composés **13d** et **13e** avec des rendements faibles de 8 et 6% respectivement.

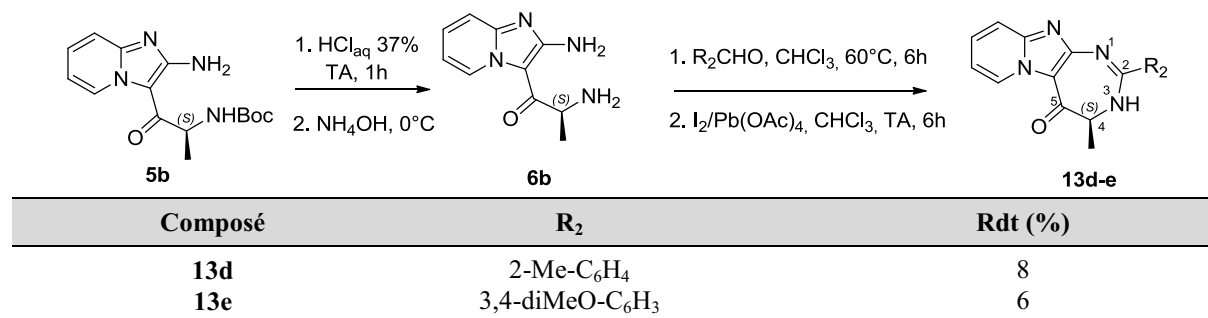


Schéma III- 24 : Synthèse des composés **13d-e**

Le dérivé hydroxyméthyle **14** a été obtenu à partir du dérivé de la sérine *O*-benzyle **13b** après déprotection par une solution d'acide bromhydrique dans l'acide acétique, avec un rendement de 93%.

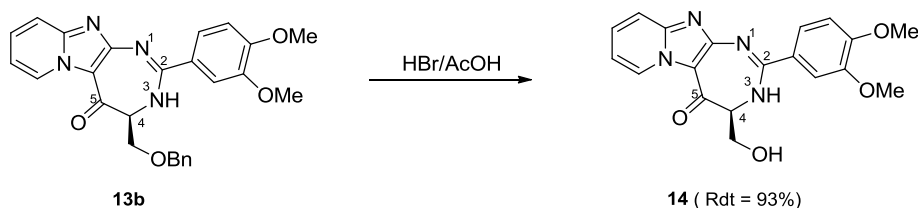


Schéma III- 25 : Synthèse du composé **14**

■ Encombrement stérique

Pour introduire de l'encombrement stérique sur la position 4 du cycle diazépinique, un groupement 1-naphtyle ou un groupement 4-benzyloxybenzyle a été introduit en position 4 de la diazépine. Pour ce faire, la 1-naphtylalanine protégée (Boc-1-Nal-OH) et le dérivé de la tyrosine *O*-benzyle ont été utilisés comme donneur d'acyl, afin d'obtenir les dérivés **5o** et **5q**. Après déprotection en milieu acide, les diamines correspondantes **6o** et **6q** ont été mises en présence de l'*ortho*-tolualdéhyde ou du 3,4-diméthoxybenzaldéhyde, pour réaliser l'étape de cyclisation/oxydation. Les dérivés **13f** et **13g** ainsi obtenus, ont été isolés avec des rendements de 45 et 65% respectivement.

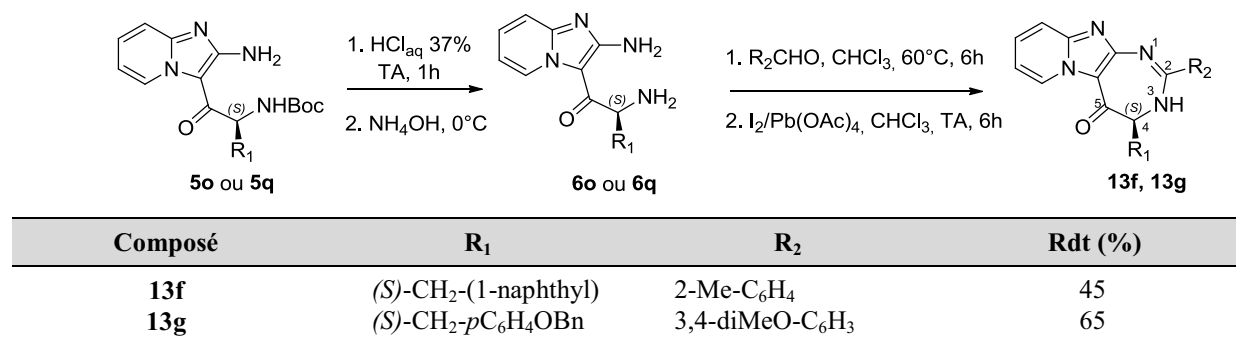


Schéma III- 26 : Synthèse des composés **13f-g**

■ Remplacement du benzyle par un 4-hydroxybenzyle

Enfin, la dernière modulation étudiée pour la position 4 du cycle diazépinique, a consisté à remplacer le noyau benzyle du composé JMV5046 (chaîne latérale de la phénylalanine), par un groupement 4-hydroxybenzyle, chaîne latérale de la tyrosine (composé **15**). Ce composé a été synthétisé à partir du composé protégé **13g**, par traitement de ce dernier par un mélange d'acide bromhydrique et d'acide acétique.

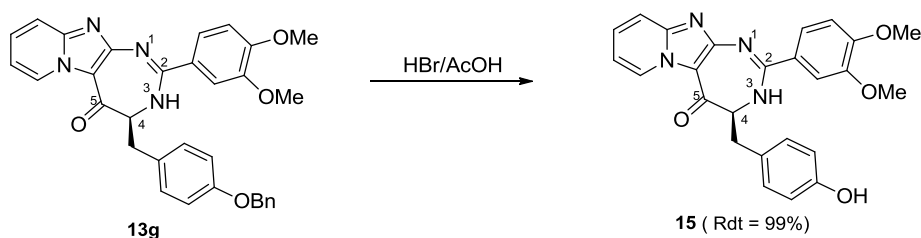


Schéma III- 27 : Synthèse du composé **15**

L'ensemble des composés issus de la modulation de la position 4 ont ensuite été testés pour déterminer leur capacité à inhiber la KLK7.

II.4.2.2. Étude de l'activité enzymatique des composés

L'étude de l'activité enzymatique a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Aucune molécule n'a montré une inhibition significative sur la KLK7 (IC₅₀ > 200 μM).

Le remplacement du groupe benzyle par un groupe méthyle (composés **13d** et **13e**) ou hydroxyméthyle (composé **14**) entraîne une perte totale de l'activité inhibitrice. Ce résultat semble indiquer que la présence d'un groupe aromatique en position 4 est important pour interagir avec l'enzyme cible. L'introduction de groupements encombrants dans cette position n'est pas favorable à l'interaction, comme l'indique l'absence d'inhibition observée pour les

composés 1-naphtyle **13f** et 4-benzylhydroxybenzyle **13g**. D'autre part, une courte élongation de la chaîne (composé **13a** et **13b**) supprime le pouvoir inhibiteur. L'introduction d'un groupe *para*-hydroxybenzyle conduit également à un composé inactif (composé **15**).

D'après les expériences de docking réalisées avec le composé JMV5046, le noyau benzyle occupe la poche S2 du site actif de la KLK7. Cette poche possède une spécificité envers les résidus Tyrosine, suivi des résidus hydrophobes de taille moyenne Leu, Nle, Thr, Met, Phe (Cf. Partie I, Section. IV.4.). Cette préférence pour le résidu benzyle semble donc en accord avec la spécificité de substrat de la KLK7, même si la perte d'activité obtenue avec le dérivé 4-hydroxybenzyle, correspondant à la chaîne latérale de la tyrosine, semble plus surprenante.

Ces résultats suggèrent qu'aucune modification n'est tolérée en position 4 et qu'un groupe benzyle est crucial à l'inhibition de la KLK7.

➤ Conclusion

La modulation du sommet 4 a conduit à la synthèse de huit composés qui se sont révélés tous inactifs à l'égard de la KLK7. Les résultats suggèrent que le groupe benzyle reste le substituant indispensable pour cette position du cycle diazépinique. Sur la base des résultats obtenus à ce stade de l'étude, les substituants favorables à l'interaction avec la KLK7 sont :

- un groupe benzyle en position 4 de configuration *S* ;
- un groupe *o*-méthylphényle ou 3,4-diméthoxyphényle en position 2.

Le JMV5046 reste ainsi le meilleur inhibiteur identifié à ce stade, pour la modulation des sommets 3 et 5 du cycle diazépinique.

II.4.3. Étude des positions 3 et 5

D'après les résultats de docking obtenus avec le composé JMV5046 (Cf. Figure III- 8), le NH en position 3 et le carbonyle en position 5 du cycle diazépinique ne semblent pas participer aux interactions entre l'inhibiteur et le site actif de KLK7 par l'établissement de liaisons hydrogène. Une modulation de ces deux sommets est alors envisageable. Pour moduler le sommet 3, nous avons décidé d'effectuer une alkylation pour accéder aux composés **16**. La modulation de la position 5 a consisté en la réduction du groupe carbonyle en hydroxyle (composé **17**).

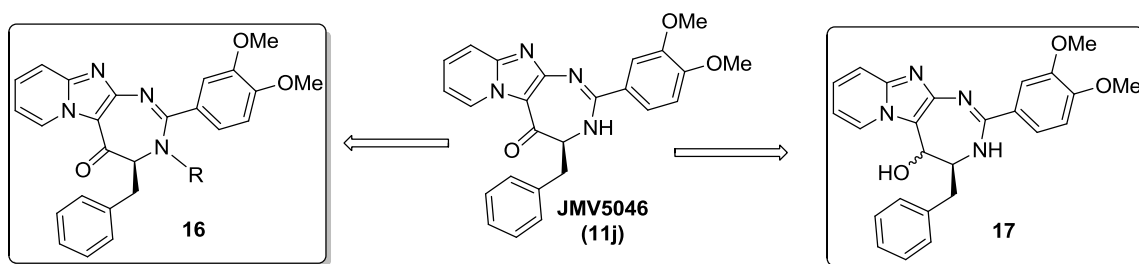


Figure III- 9 : Structures des composés cibles pour l'étude des positions 3 et 5

II.4.3.1. Synthèse du composé 16

Deux voies de synthèse peuvent potentiellement conduire aux dérivés *N*3-alkylés **16**. La synthèse de ces composés peut être envisagée à partir du composé cyclique **11j** par *N*-alkylation directe (voie I, Schéma III- 28). Cette approche offre l'avantage de pouvoir diversifier facilement la position 3 du cycle diazépine en utilisant divers halogénures d'alkyle. Une seconde voie consiste à introduire le reste alkyle en amont de la cyclisation (voie II). Dans ce cas, l'intermédiaire *C*-acylé et *N*-alkylé peut être obtenu à partir du dérivé diamine **6a** par amination réductrice (voie a). Cette voie offre également l'avantage de pouvoir diversifier facilement la position 3 en utilisant divers aldéhydes. Enfin, une autre approche consiste à réaliser l'acylation régiosélective de la 2-aminoIP en utilisant un acide aminé, portant déjà le reste alkyle. L'introduction d'un reste méthyle sur l'azote 3 du cycle diazépinique a été initialement entreprise.

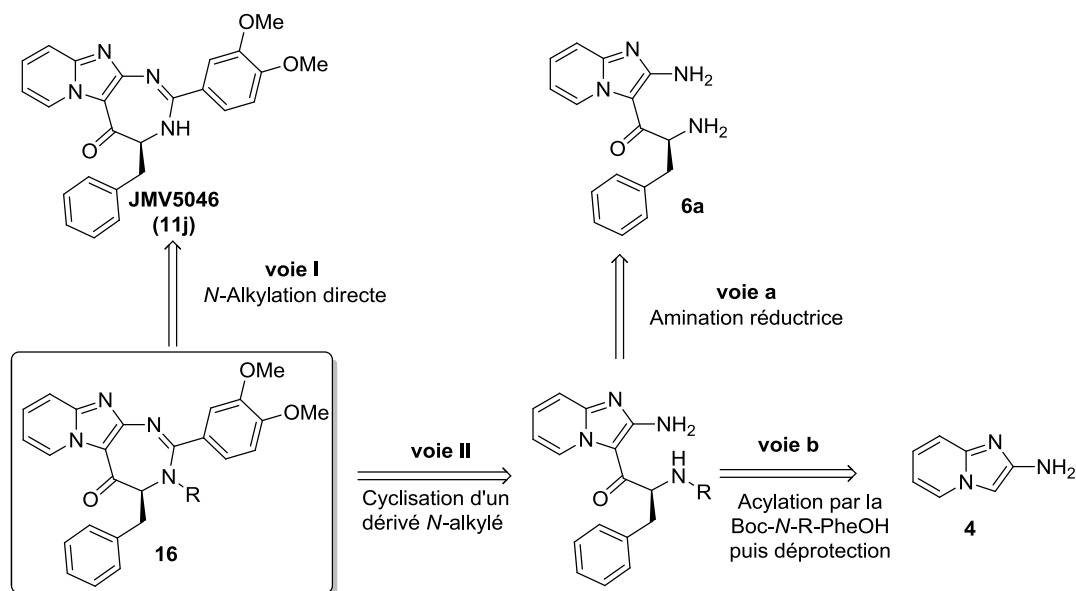


Schéma III- 28 : Approche rétro-synthétique pour accéder aux dérivés *N*-alkylés **16**

➤ **Synthèse du composé 16 selon la voie I : *N*-méthylation directe du composé 11j**

Une réaction de *N*-méthylation nécessite une étape préalable de déprotonation de l'amine avec une base. Les premiers essais de *N*-méthylation du composé **11j** ont été effectués en utilisant l'hydruire de sodium (NaH) comme agent de déprotonation (1.1 équivalent), et l'iodométhane comme agent de méthylation (2 équivalents). Dans ces conditions, le produit désiré n'est pas formé. L'ajout de plusieurs équivalents supplémentaires de réactifs (NaH, CH₃I) dans le milieu réactionnel et une agitation pendant plusieurs heures (48 h) à température ambiante, n'ont pas permis d'amorcer la méthylation. Seul le produit de départ est détecté.

L'hydruire de sodium a donc été remplacé par le *tert*-butylate de sodium (*t*BuONa) (1.1 équivalent) pour réaliser un autre essai en utilisant deux équivalents d'iodométhane. La réaction est maintenue sous agitation pendant 16 heures à température ambiante. Dans ces conditions expérimentales, un dérivé *N*-méthylé se forme mais s'accompagne d'autres composés (Schéma III- 29). Il est finalement isolé avec un rendement de 31% après purification par colonne chromatographique.

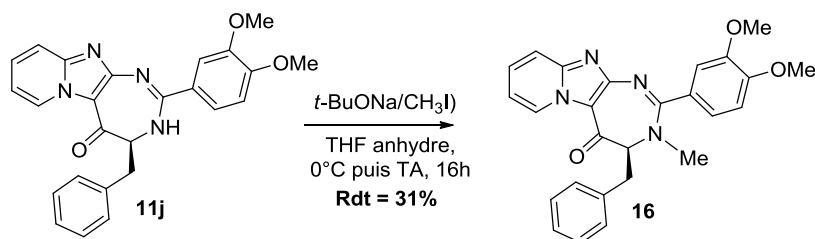


Schéma III- 29 : *N*-Méthylation du composé cyclique 11j

L'analyse LC-MS du produit révèle la présence d'un ion moléculaire de rapport masse sur charge (*m/z*) égal à 441 correspondant à la masse du composé attendu. Cependant, une analyse RMN du proton réalisée sur le produit montre, en plus des signaux correspondant au produit attendu, l'existence d'impuretés non détectées par LC-MS. Une purification supplémentaire par chromatographie n'a pas permis d'améliorer la pureté du composé. La *N*-méthylation n'ayant pas permis d'obtenir le composé **16** avec une pureté satisfaisante, sa synthèse a été envisagée selon la voie II.

➤ **Synthèse à partir de l'intermédiaire C-acylé et N-méthylé (Voie II)**

Cette approche consiste à condenser l'intermédiaire C-acylé N-méthylé avec le 3,4-diméthoxybenzaldéhyde et à oxyder *in situ* l'aminal résultant. Cela nécessite de synthétiser au préalable cet intermédiaire. Deux stratégies de synthèse de ce composé sont possibles.

• **Obtention de l'intermédiaire 6p par amination réductrice (voie a)**

L'amination réductrice, connue également sous le nom d'alkylation réductrice est une réaction dans laquelle un groupe carbonyle (aldéhyde ou cétone) est converti en amine *via* un intermédiaire imine. Cette approche permet d'envisager facilement l'introduction à partir du synthon diamine **6a** de diverses chaînes alkyles.

Pour accéder à l'intermédiaire diamine monométhylée **6p**, nous avons fait réagir le composé **6a** avec le formaldéhyde dans l'acétonitrile. Ensuite, sans isoler l'imine résultante, nous avons procédé à sa réduction en ajoutant du cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN) dans le milieu réactionnel. La réaction a été suivie par HPLC. Une analyse LC-MS réalisée sur le brut réactionnel indique la disparition du produit de départ et la formation du composé d'intérêt. Toutefois, il se forme également de nombreux produits secondaires que nous n'avons pas été en mesure d'identifier.

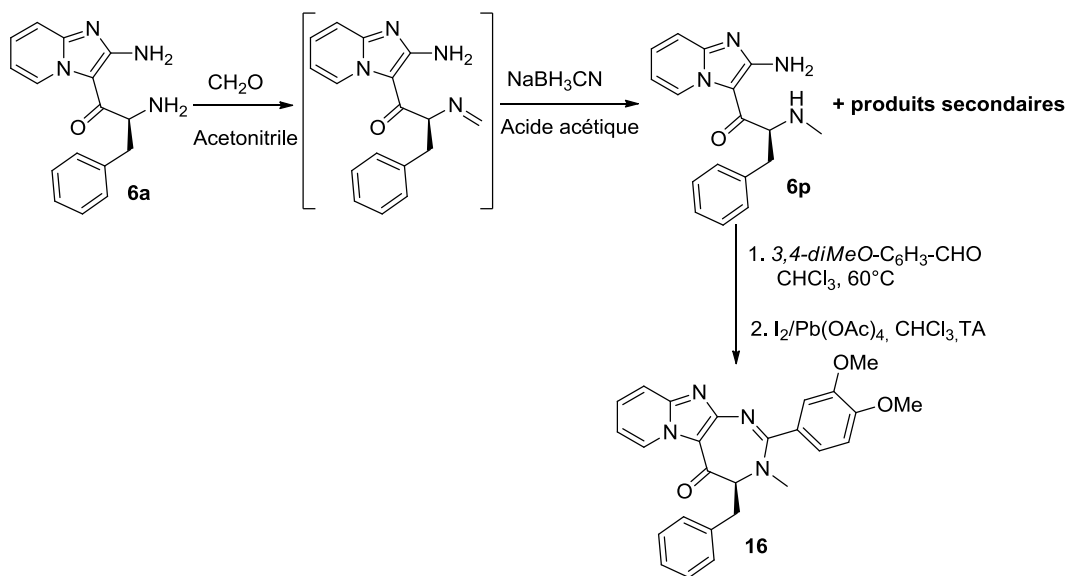


Schéma III- 30 : Synthèse du composé **16** *via* amination réductrice

Une purification par chromatographie sur gel d'alumine n'a pas permis de séparer le composé d'intérêt des produits secondaires. Le mélange a donc été utilisé tel quel pour tenter

une cyclisation avec le 3,4-diméthoxybenzaldéhyde suivie d'une oxydation *in situ*. L'analyse LC-MS montre bien la présence du produit d'intérêt. Toutefois, le composé oxydé n'a pu être séparé des impuretés. Cet échec pourrait s'expliquer par les difficultés de synthèse et de purification liées à la réaction d'amination réductrice.

En vue de contourner ces problèmes, nous avons décidé d'introduire le groupement méthyle dès l'étape d'acylation régiosélective, en utilisant la Boc-*N*-méthylphénylalanine comme donneur d'acyle.

➤ **Obtention de l'intermédiaire 6p via une acylation régiosélective avec la Boc-*N*-méthyl-Phénylalanine (voie b)**

La synthèse de l'intermédiaire **6p** à partir de la 2-amino-IP est décrite dans le chapitre II.2. Le précurseur **5c** est obtenu avec un rendement de 67% après purification chromatographique. La réaction entre le dérivé **6p**, et le 3,4-diméthoxybenzaldéhyde a finalement permis d'aboutir au composé **16** avec un rendement de 54%.

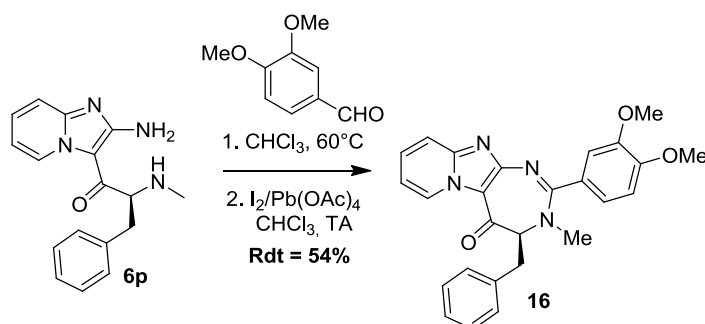


Schéma III- 31 : Synthèse du composé **16** à partir de l'intermédiaire *N*-méthyl-acyl-IP

II.4.3.2. Synthèse du composé 17

La réduction d'un groupe carbonyle implique l'adjonction d'un hydrure au carbone et celle d'un proton à l'oxygène. Le caractère électrophile du carbone est mis à profit lors de réductions à l'aide d'hydrures. Le borohydrure de sodium (NaBH₄) et l'hydrure de lithium aluminium (LiAlH₄) sont des exemples d'hydrures classiquement utilisés pour réduire les fonctions cétones en alcool. Les réactions de réduction de ce genre ont souvent lieu dans des solvants protiques tels que l'éthanol ou le méthanol.

Dans le cas du composé JMV5046, deux fonctions peuvent être potentiellement réduites : la fonction cétone et la fonction pseudo-amidine du cycle diazépinique. Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi d'utiliser le méthanol comme solvant protique et le

NaBH₄ comme donneur d'hydrure, en raison de la plus grande sélectivité de ce réactif envers les cétones comparée à l'hydrure de lithium aluminium. La réaction a été réalisée par ajout progressif de 3 équivalents de NaBH₄ à 0°C. Le milieu réactionnel est ensuite agité à température ambiante pendant 1 heure supplémentaire. L'analyse HPLC montre une conversion d'environ 80% du produit de départ et la présence de plusieurs impuretés (environ 10%). La réaction a été cependant stoppée sans atteindre son terme, par l'ajout d'une solution aqueuse de chlorure d'ammonium. En effet, un temps de réaction plus long conduit à une augmentation de la proportion en produits secondaires.

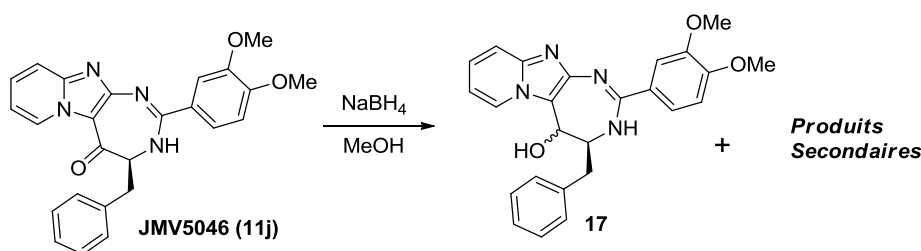


Schéma III- 32 : Essai de réduction de réduction du composé JMVS046

Une analyse LC/MS du brut révèle la présence du composé d'intérêt $[M+H]^+ = 429$ et de deux produits secondaires : $[M+H]^+ = 431$ et $[M+H]^+ = 281$.

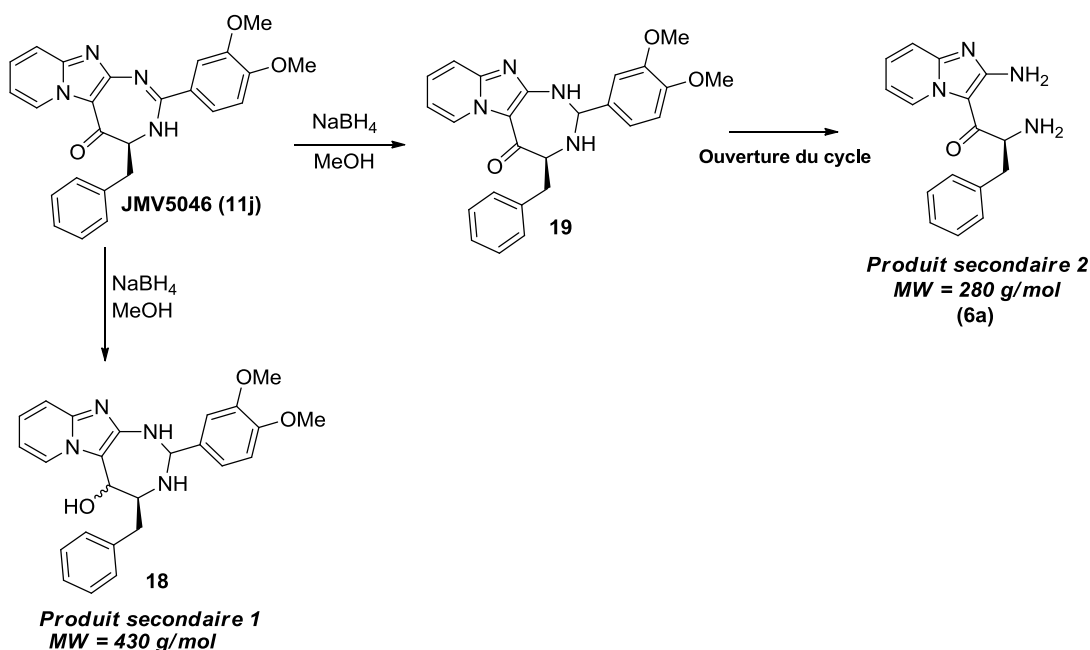


Schéma III- 33 : Hypothèse de formation des produits secondaires au cours de la réduction par NaBH₄

Le produit de rapport m/z 431 pourrait être issu de la double réduction de la liaison C=N du cycle diazépine et de la fonction cétone (composé **18**). Le composé de rapport m/z

281, qui pourrait correspondre à l'intermédiaire diamine **6a**, proviendrait d'une réduction préalable de cette même liaison C=N suivie d'une ouverture du cycle sans réduction de la fonction cétone (Schéma III- 33).

Le produit désiré est isolé après purification par colonne chromatographique sur gel d'alumine avec un rendement de 15%. Ce résultat semble indiquer que le nombre d'équivalents de NaBH₄ utilisé dès le départ pourrait avoir une influence sur l'efficacité de la réduction et que cette réaction pourrait être optimisée. L'analyse RMN ¹H indique que le produit **17** correspond au mélange de diastéréoisomères dans un ratio 50/50.

II.4.3.3. Étude de l'activité enzymatique

L'activité inhibitrice des composés **16** et **17** a été évaluée dans les conditions habituelles de cinétique. Aucun des deux composés n'a permis d'avoir une inhibition significative de la KLK7, suggérant ainsi que le NH et le groupe carbonyle pourraient, soit participer à des liaisons hydrogène dans le site actif, contrairement à ce que le docking prévoit, soit modifier la géométrie du cycle diazépinique et perturber par conséquent l'interaction avec l'enzyme.

La synthèse des composés de la série 3 a été envisagée, pour accéder à des composés plus flexibles que les dérivés diazépinoles.

II.5. Étude de la série 3 : dérivés "amides"

Les dérivés ouverts de type « amides » possèdent une plus grande flexibilité contrairement aux dérivés diazépinoles. Cette flexibilité structurale pourrait faciliter *a priori* leur positionnement dans la poche enzymatique et donner lieu à de meilleures interactions entre l'inhibiteur et la protéase.

Par ailleurs, comme précédemment rapporté dans la section II-4-1, la synthèse de pyrido-imidazo-1,3-diazépinoles portant un reste benzyle ou phényl en position 2, reste difficile, en utilisant la réaction de cyclisation/oxydation d'une diamine en présence d'aldéhydes aliphatiques. Ceci constitue donc une limite pour poursuivre les études de relation structure activité de ces composés. Les composés ouverts pourraient alors servir de précurseurs pour accéder à des IP-diazépin-5-ones possédant en position 2 des chaînes alkyles.

Nous présentons dans un premier temps l'obtention des dérivés ouverts. Ensuite, nous décrirons les voies de synthèse étudiées pour accéder aux composés IP-diazépin-5-ones à partir des dérivés ouverts. Enfin, l'étude de leur action inhibitrice sur la KLK7 sera détaillée.

II.5.1. Synthèse des composés

Tous les composés ont été synthétisés à partir de l'intermédiaire diamine **6a**, en vue de conserver le groupe benzyle présent dans les composés JMV4967 et JMV5046. La diamine **6a** est couplée avec différents acides commerciaux dans les conditions identiques à celles de la réaction d'acylation régiosélective de la 2-aminoIP (Schéma III- 34 et Tableau III- 1).

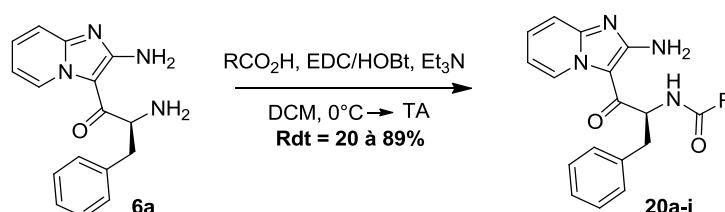
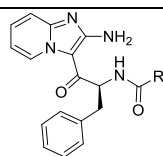


Schéma III- 34 : Synthèse des composés **20a-i**

L'acide *ortho*-méthylbenzoïque et l'acide 3,4-diméthoxybenzoïque ont été successivement introduit sur la diamine **6a**, afin de mimer les substituants présents sur les premiers hits (composés **20b** et **20e**). L'acide benzoïque, l'acide phénylacétique, l'acide cinnamique, et l'acide phénylpropionique ont été ensuite couplés à la diamine **6a**, afin d'étudier l'influence de l'éloignement du noyau aromatique de la fonction amide (composés **20a**, **20c**, **20d**, **20i**). Enfin, divers hétérocycles ont été introduits (composés **20f** à **20h**).

L'avancement de la réaction est suivi par CCM d'alumine (éluant CH₂Cl₂/EtOH 99:1 v/v). A la fin de la réaction, le mélange réactionnel est lavé avec une solution aqueuse saturée d'hyrogénocarbonate de sodium. Le brut est ensuite purifié par colonne chromatographique sur gel d'alumine (éluant CH₂Cl₂/EtOH 99:1 v/v) pour donner les composés **20a-i** avec des rendements allant de 20 à 89% (Tableau III- 10).



Composé	R	Rdt (%)
20a		68
20b		76
20c		84
20d		20
20e		89
20f		53
20g		80
20h		88
20i		85

Tableau III- 10 : Liste des dérivés "amides" synthétisés et rendements associés

Comme nous l'avons observé précédemment lors des essais de carbonylation intramoléculaire (*Cf.* section II.3), l'acylation s'effectue sur l'amine portée par le résidu de la phénylalanine. La position d'acylation a été prouvée en faisant une analyse RMN. En effet, une expérience RMN HMBC ^1H - ^{13}C du composé **20a** met en évidence une corrélation 3J entre le proton α du résidu phénylalanine à 5,85 ppm et un carbone à 168.7 ppm correspondant au carbonyle de la fonction amide (Figure III- 10). Cette observation confirme que l'amine exocyclique est beaucoup moins réactive que l'amine du résidu de l'acide aminé.

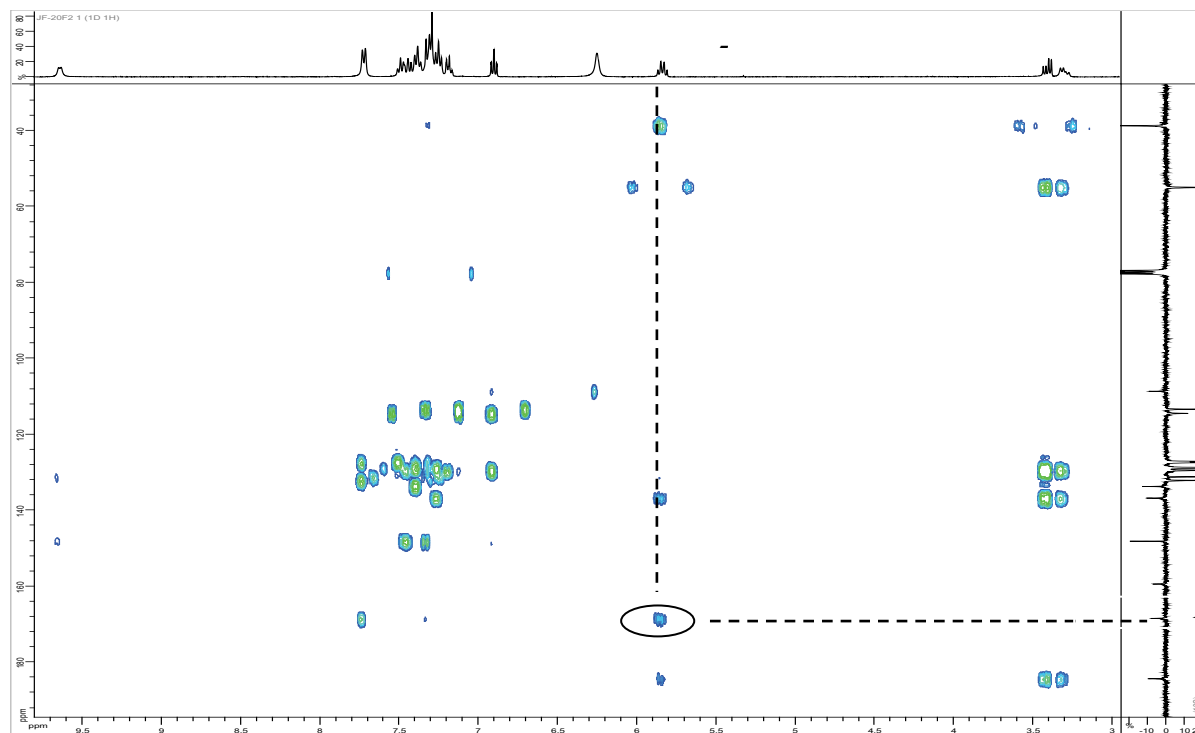
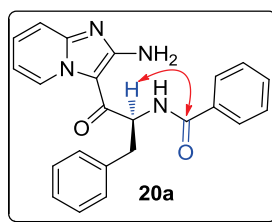


Figure III- 10 : Spectre RMN ^1H - ^{13}C HMBC du composé 20a dans le CDCl_3

Outre leur intérêt en tant qu'inhibiteurs potentiels de KLK7, les dérivés amides peuvent également servir de composés de départ pour accéder après cyclisation aux diazépinoles.

II.5.2. Étude de la cyclisation des dérivés amides

Pour accéder aux composés IP-diazépin-5ones, à partir des dérivés amide **20**, il faut envisager une attaque nucléophile intramoléculaire de l'amine exocyclique sur la fonction amide, comme l'illustre le schéma suivant.

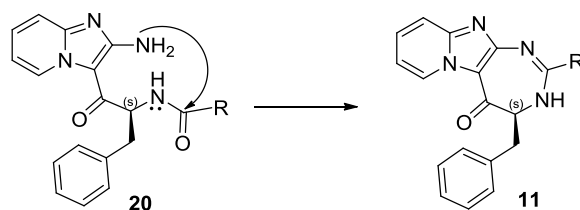


Schéma III- 35

La formation du cycle diazépique selon cette approche nécessite que le carbone de la liaison amide soit appauvri en électrons. Or, la délocalisation du doublet de l'azote dans la liaison amide diminue le caractère électrophile du carbone amidique. Les méthodes de cyclisation que nous avons testées sont celles qui permettent d'augmenter le caractère électrophile du carbone de la liaison amide.

a) Cyclisation via la méthode de Bischler-Napieralski

Cette méthode fut décrite par A. Bischler et B. Napieralski en 1893 pour la synthèse de dérivés isoquinoléines à partir de composés β -aryléthylamides (Schéma III- 36). La cyclisation de Bischler-Napieralski a été largement utilisée pour la synthèse d'alcaloïdes à noyau quinoléine ou de dérivés thiophènes. C'est une réaction de cyclo-déshydratation qui a lieu dans des solvants à reflux tels que le toluène ou le xylène. Elle implique une étape initiale de déshydratation de l'amide suivie de la cyclisation. Pour promouvoir la perte de l'oxygène du carbonyle, on utilise généralement des agents déshydratants tels que POCl_3 , P_2O_5 , SOCl_2 , ZnCl_2 anhydre.²⁸⁸ Cette méthode fut également appliquée avec succès par Z. Zhu et *al.* pour la synthèse de dérivés 1,3-diazépines.²⁸⁹

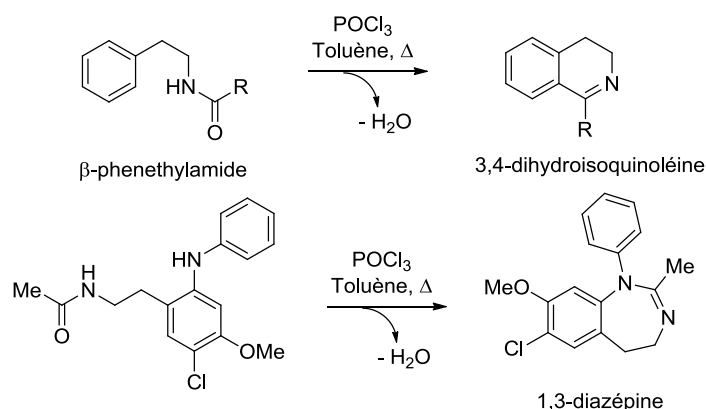


Schéma III- 36 : Exemple de synthèse de dérivés d'isoquinoléine et de 1,3-diazépine par la méthode de Bischler-Napieralski

En vue d'appliquer cette méthode à la synthèse d'IP-diazépin-5-ones, nous nous sommes proposés de synthétiser le JMV4967 à partir du dérivé amide **20b**. Le toluène a été utilisé comme solvant, et l'oxychlorure de phosphore (POCl_3) comme agent de condensation. L'oxychlorure de phosphore permet de transformer la fonction amide en imidoylphosphate qui est un bon groupe partant. Il est à noter que ce réactif est susceptible de subir l'attaque de l'oxygène de l'amide mais aussi celle de l'amine exocyclique. Toutefois, le caractère hautement oxophile du phosphore devrait privilégier l'attaque de l'oxygène de l'amide par rapport à l'amine exocyclique et favoriser par conséquent la formation de l'imidoylphosphate. Cette transformation devrait augmenter l'électrophilie du carbone et favoriser la formation du cycle diazépinique *via* une attaque nucléophile de l'amine exocyclique.

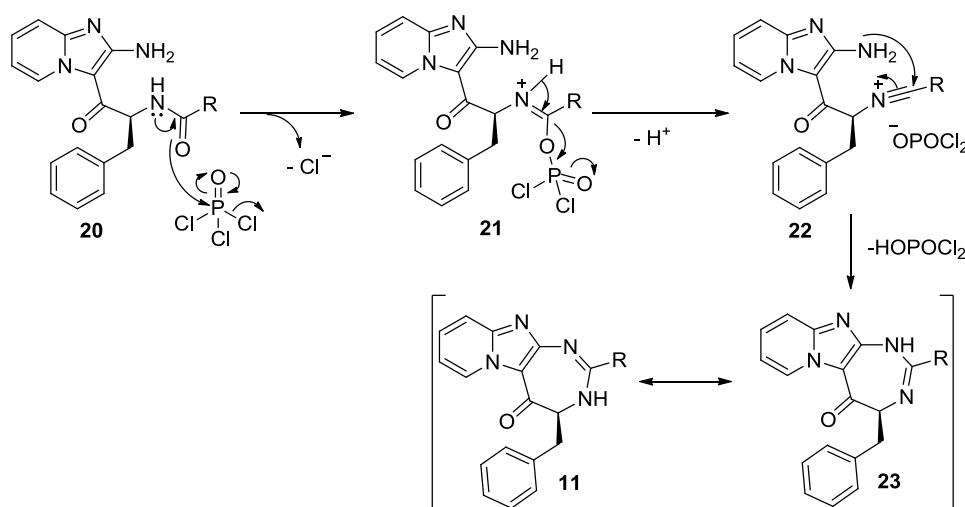


Schéma III- 37 : Mécanisme proposé pour la formation des IP-diazépin-5-ones par la méthode de Bischler-Napieralski

Le dérivé amide **20b** a alors été traité par un excès de POCl_3 (10 équiv.) dans le toluène. La réaction est maintenue à reflux pendant 24h, et suivie par CCM et HPLC-MS. Une très lente conversion du produit de départ a été notée. L'analyse LC-MS au bout de 24h de réaction indique la présence d'un ion moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+ = 399$ (produit majoritaire), correspondant au produit de départ et d'un produit à l'état de traces dont la masse correspond à celle du composé d'intérêt ($[\text{M}+\text{H}]^+ = 381$). L'ajout dans le milieu réactionnel de deux équivalents de POCl_3 supplémentaires a permis de consommer entièrement le produit de départ. Toutefois, le composé majoritairement formé ne correspond pas au produit attendu mais à un composé de masse molaire égale à 627 g.mol^{-1} . Le produit d'intérêt n'étant plus détecté qu'à l'état de traces, la réaction est finalement arrêtée. Après évaporation du solvant de

la réaction, le résidu est repris dans de l'eau et l'acide chlorhydrique généré au cours de la réaction est neutralisé avec du carbonate de potassium. Un solide vert est obtenu après extraction au chloroforme et élimination du solvant sous pression réduite. Une purification par colonne chromatographique sur gel d'alumine, avec comme système de solvants un mélange de DCM/EtOH (99 :1, v/v), a permis d'isoler le produit majoritaire de masse molaire égale à 627 g.mol⁻¹, avec un rendement de 47%.

L'analyse RMN 1D et 2D montre la disparition de la fonction cétone, ainsi que du signal correspondant au CH_α issu de la phénylalanine. De plus, on note la présence de deux singulets à 3,85 et 3,76 ppm intégrant chacun pour 2 protons et de 2 singulets à 2,59 et 2,54 ppm intégrant chacun pour 3 protons. Ceci semble indiquer un réarrangement important dans la molécule avec présence de deux noyaux *ortho*-méthylphényle et disparition du couplage CH_α-CH₂ benzylique. La présence de nombreux protons aromatiques rend difficile l'interprétation de cette zone du spectre. Il semble toutefois qu'un seul noyau imidazo-[1,2-*a*]pyridine soit présent. De plus, l'absence d'un doublet fortement déblindé, correspondant au H-5 des dérivés 3-acyl-IP, semble confirmer la disparition de la fonction cétone de la molécule. Une spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) réalisée sur l'ion parent ([M+H]⁺ = 628) donne un fragment de rapport m/z = 511 soit une différence de masse de 117 unités ne correspondant à aucune perte logique. Ces analyses n'ont pas permis d'identifier la structure du composé formé.

Pour expliquer ce résultat, quelques hypothèses peuvent être émises. Il est bien établi que le caractère oxophile très marqué du phosphore constitue la force motrice de nombreuses réactions. Dans les dérivés IP « amides » de type **20**, deux atomes d'oxygène peuvent potentiellement réagir sur l'oxychlorure de phosphore : l'oxygène de la fonction amide et celui de la fonction cétone. Le produit désiré devrait en principe s'obtenir *via* l'attaque de l'oxygène de l'amide selon la séquence réactionnelle décrite précédemment (Schéma III- 37). Nous avons évoqué précédemment, la réactivité particulière de type « ène-amine » de la 2-aminoimidazopyridine, décrite dans notre laboratoire. En accord avec cette observation, une des hypothèses possibles est que la délocalisation du doublet de l'azote de l'amine exocyclique rendrait nucléophile l'oxygène de la cétone qui peut alors attaquer le POCl₃ comme l'illustre le Schéma III- 38. Cette réactivité pourrait expliquer l'absence de fonction cétone dans le produit issu de cette réaction, comme observé lors de l'analyse du spectre RMN

^{13}C . On pourrait également imaginer une attaque de l'amine exocyclique sur l'oxychlorure de phosphore favorisant ainsi la formation de nombreux produits secondaires.

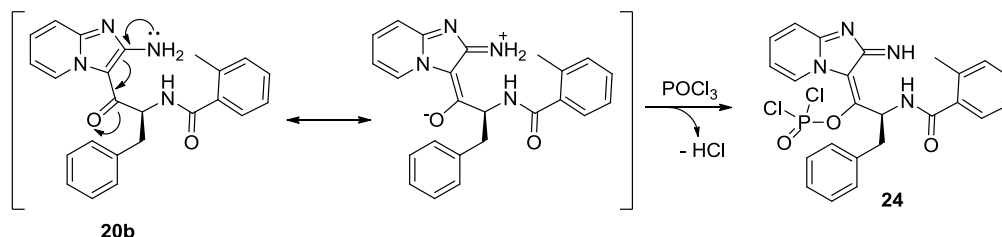


Schéma III- 38

La cyclisation par la méthode de Bischler-Napieralski n'ayant pas permis d'obtenir le dérivé cyclique, une autre technique de cyclisation a été explorée.

b) Cyclisation via la transformation des dérivés amides en dérivés thioamides

Une autre manière de diminuer la densité électronique du carbone amidique est de transformer la fonction amide en thioamide et d'activer l'atome de soufre. Nous avons donc décidé d'étudier cette approche. Le réactif de Lawesson a été choisi comme agent de thionation pour les premiers essais, et le benzoate d'Argent(I) (sels thiophiliques) ou l'iodométhane ont été employés pour activer le thioamide formé. Le benzoate d'Argent(I) active le soufre par complexation (formation de sels thiophiliques) tandis que l'iodométhane l'active par *S*-méthylation. L'atome de soufre ainsi activé contribue à augmenter l'électrophilie du carbone et devrait favoriser la cyclisation comme l'illustre le Schéma III-39.

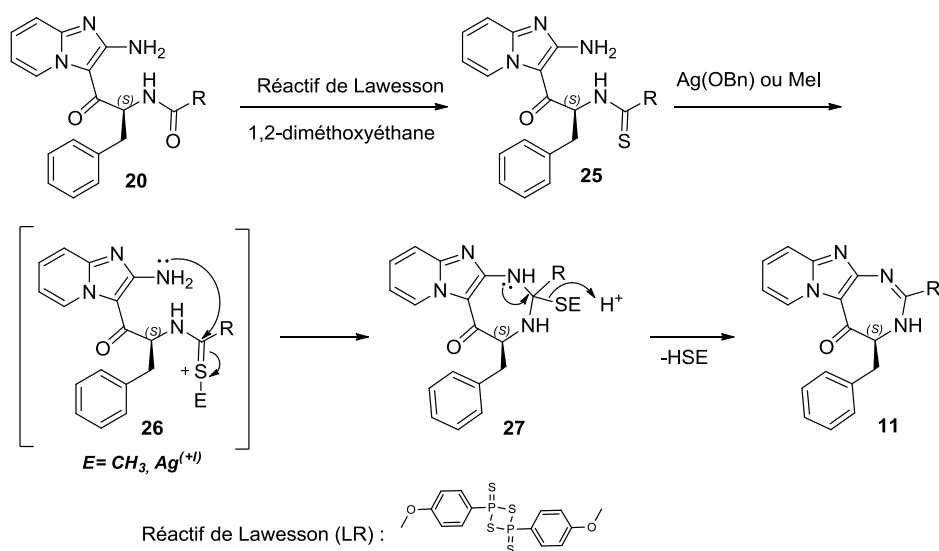


Schéma III- 39 : Mécanisme proposé pour la cyclisation *via* la transformation en thioamide

Le composé **20b** (dérivé de l'acide *ortho*-méthylbenzoïque) a été utilisé pour cette étude. La réaction de thionation a été engagée en présence 0.55 équivalent de réactif de Lawesson dans le 1,2-diméthoxyéthane à température ambiante. Les contrôles HPLC et LC-MS des premières heures mettent seulement en évidence le produit de départ **20b**. Au bout de 48h, une analyse LC-MS détecte la présence d'un ion moléculaire de rapport $m/z = 381.1$ correspondant au produit cyclisé (conversion <10%). Aucune autre espèce n'a été détectée au cours de la réaction. Un chauffage prolongé (24h) suivi de l'ajout de 0.55 équivalent du réactif de Lawesson n'ont pas permis d'augmenter la proportion en thioamide. La réaction est finalement arrêtée. Après évaporation du solvant, le résidu est repris à l'eau et extrait à l'acétate d'éthyle. Une purification par colonne chromatographique d'alumine (éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 99:1 v/v) a permis de récupérer uniquement le produit de départ. La formation difficile du thioamide par cette approche est peut être expliquée par un encombrement stérique important autour de l'amide empêchant l'approche et l'attaque du réactif de thionation.

L'utilisation d'un autre réactif de thionation, le pentasulfure de diphosphore (P_2S_5) dans l'acétonitrile à reflux, n'a pas permis non plus d'obtenir le dérivé thioamide. Compte tenu des difficultés à obtenir les IP-diazépin-5-ones à partir des dérivés ouverts, cette approche a été abandonnée. Toutefois, l'étude de l'action inhibitrice des dérivés amides sur la KLK7 a été effectuée.

II.5.3. Étude de l'activité enzymatique

L'activité inhibitrice des composés ouverts a été évaluée dans les conditions habituelles de cinétique enzymatique. Parmi les composés, seulement deux dérivés portant un substituant R de type 2-méthylphényle ou benzyle (composé **20b** et **20c**) montrent une faible activité inhibitrice à l'égard de la KLK7 ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$). Les résultats obtenus sont rapportés dans le Tableau III- 11. Bien que les dérivés ouverts soient plus flexibles que les dérivés diazépines, ce qui pourrait éventuellement améliorer la reconnaissance moléculaire, l'augmentation de leur entropie conformationnelle dans ce genre de composés est défavorable à l'activité. Ces résultats suggèrent que la rigidité apportée par le cycle diazépique est cruciale pour avoir un effet inhibiteur sur la KLK7.

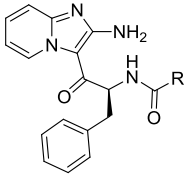



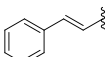
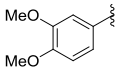




		
Composé	R	IC ₅₀ (μM) (KLK7)
20a		ni
20b		135,4 ± 9,2
20c		149,2 ± 19,2
20d		ni
20e		ni
20f		ni
20g		ni
20h		ni
20i		ni

Tableau III- 11 : IC₅₀ sur la KLK7 des dérivés amides **20a-i** après 15 minutes d'incubation à 37°C et à pH 8,0
ni = non inhibition [IC₅₀>200 μM (<30% inhibition à 50 μM)]

➤ Conclusion

Nous avons procédé à l'ouverture du cycle diazépique pour avoir des composés plus flexibles. Neuf composés ouverts de type amide ont été ainsi synthétisés et testés. Cependant, aucune inhibition significative n'a été observée sur l'enzyme cible. Les résultats montrent que l'introduction d'une flexibilité structurale est préjudiciable à l'activité inhibitrice à l'égard de la KLK7. Par conséquent, la rigidité apportée par le cycle diazépique semble indispensable à l'inhibition. Les efforts pour accéder à des composés cycliques à partir de ces dérivés ouverts n'ont pas été concluants. L'accès à des dérivés 1,3-diazépines substitués par une chaîne alkyle reste donc difficile.

II.6. Conclusion générale des études de RSA

Un premier criblage de molécules hétérocycliques développées dans notre laboratoire, a permis d'identifier un composé inhibiteur sélectif de la KLK7, le JMV4967. Une étude de

relations structure-activité a alors initiée en vue de préciser les requis structuraux indispensables à l'activité inhibitrice, et d'identifier des composés analogues plus puissants. Trois séries de composés ont ainsi développées : les dérivés pyrido-imidazodiazépin-2,5-diones ou urées (série 1), les dérivés pyrido-imidazodiazépin-5-ones analogues de JMV4967 (série 2) et les dérivés "amides" qui peuvent être considérées comme des pyrido-imidazodiazépinones ouvertes (série 3). Les dérivés « urée » et « amide » se sont révélés inactifs à l'égard de la KLK7. Les meilleures inhibitions ont été obtenues avec les analogues du JMV4967 possédant en position 2 du cycle diazépique, un groupe 3,4,5-triméthoxyphényle (composé **11k**) ou 3,4-diméthoxyphényle (composé **11j**). Cela a conduit à la découverte d'un composé, le JMV5046 ($IC_{50} = 33,5 \mu M$), plus actif que le hit initial JMV4967 ($IC_{50} = 57,0 \mu M$). A l'instar du hit initial, le JMV5046 est un inhibiteur sélectif, réversible et compétitif de la KLK7.

Des études de la cytotoxicité des composés synthétisés, ont été alors entreprises. Ces études ont été réalisées sur des cellules normales, afin de déterminer l'innocuité éventuelle des composés sur les cellules saines. D'autre part, l'activité des composés a été évaluée sur plusieurs lignées cancéreuses surexprimant ou non la KLK7.

II.7. Étude de la cytotoxicité des composés

L'effet cytotoxique des composés a été évalué sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses humaines. Pour ce faire, 23 composés ont été sélectionnés sur la base de leur activité sur la KLK7, en considérant comme valeur seuil minimale une inhibition de 30%. Parmi les 23 composés, 6 ont montré une IC_{50} inférieure à $100 \mu M$ sur la KLK7 (composés **11f-g**, **11i-k** et **JMV4967**). Les 17 autres composés sont non actifs sur la KLK7 ($IC_{50} > 100 \mu M$) (dérivés issus de la série urée et diazép-5-ones **11h** et **13e**). Les composés ont été initialement testés à $100 \mu M$ sur 4 lignées tumorales. Deux lignées ne surexpriment pas la KLK7 : cellules HeLa (cellules cancéreuses issues de cancer du col de l'utérus métastasé) et cellules péritumorales HaCat (kératinocytes immortels issus de la peau humaine adulte). Deux autres lignées qui surexpriment la KLK7 ont également été sélectionnées : cellules cancéreuses PC-3 de la prostate et cellules SW-620 du colon.

L'effet cytotoxique des composés sélectionnés, a également été évalué sur des cellules normales en utilisant la lignée HEK-293 comme modèle de cellules saines (cellules

embryonnaires de rein humain). Un composé est considéré comme cytotoxique, si l'exposition des cellules à ce composé entraîne une mort cellulaire d'au moins 50% à 100 μ M.

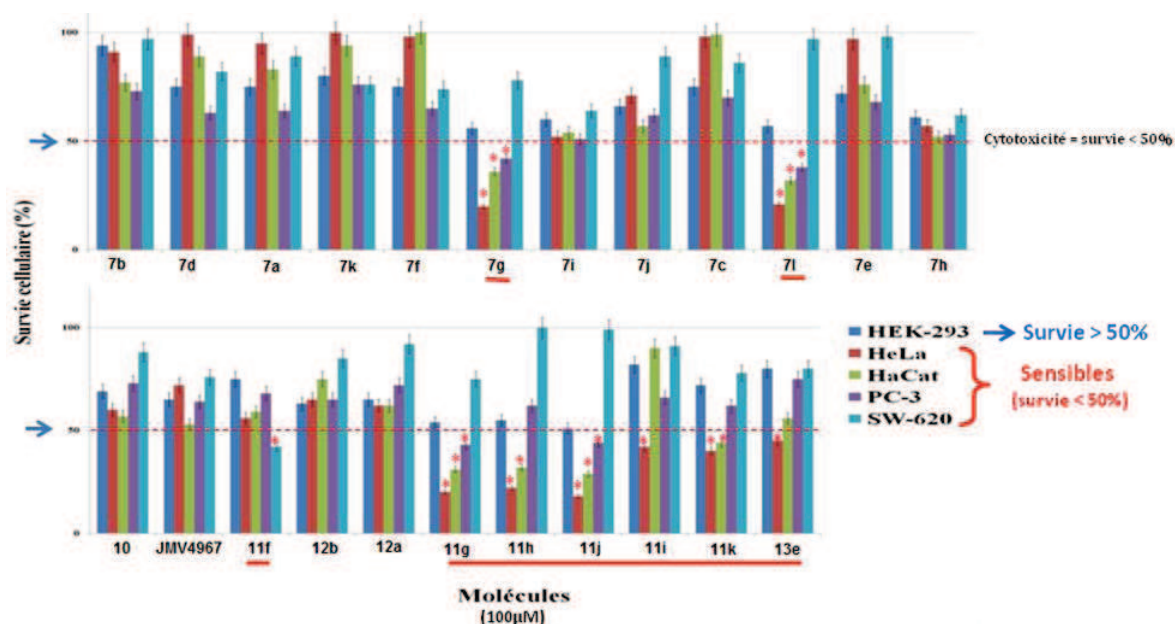


Figure III- 11 : Résultats des tests de cytotoxicité (Test XTT) de 23 molécules sur les lignées HEK-293, HaCat, PC-3 et SW-620. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie cellulaire.

Le composé JMV4967, notre hit initial, ne présente aucune toxicité vis-à-vis des 4 lignées testées, à la dose de 100 μ M. Parmi les 22 autres composés testés, 9 ont montré une toxicité à l'égard de certaines lignées cancéreuses à 100 μ M. Les composés les plus actifs ont alors fait l'objet d'une détermination de leur EC_{50} (dose efficace à 50%), et les résultats sont répertoriés dans le Tableau III- 12.

Composé	Lignée / EC_{50} (μ M)				IC_{50} sur la KLK7 (μ M)
	HeLa	HaCat	PC-3	SW-620	
7g	30,02 \pm 3,6	40,20 \pm 2,6	62,50 \pm 0,7	-	-
7l	28,80 \pm 3,7	34,50 \pm 1,3	75,00 \pm 6,7	-	-
11f	-	-	-	67,80 \pm 3,4	83,9 \pm 1,7
11g	26,50 \pm 2,0	45,40 \pm 1,4	57,50 \pm 1,9	-	98,9 \pm 10,2
11h	29,70 \pm 2,0	33,50 \pm 3,0	-	-	-
11i	40,00 \pm 1,5	-	-	-	80,9 \pm 2,5
11j	24,30 \pm 1,6	30,00 \pm 2,1	64,80 \pm 2,3	-	33,5 \pm 1,5
11k	53,80 \pm 3,5	34,20 \pm 2,5	-	-	55,7 \pm 2,3
13e	44,50 \pm 2,7	-	-	-	-

Tableau III- 12 : Quantification de l'effet cytotoxique des composés sur les lignées concernées. Pour chaque lignée, la plus faible valeur de l' EC_{50} est indiquée en gras. Sont indiquées, les valeurs de l' IC_{50} des composés sur la KLK7. (- : absence de cytotoxicité ou d'inhibition de l'activité de la KLK7).

La lignée HeLa est la plus sensible à ces composés, suivie des lignées HaCat, PC-23 et SW-620. Le taux de survie des cellules HEK-293 est supérieur à 50% pour tous les composés. Le composé **11f** est le seul composé qui présente une faible activité cytotoxique vis-à-vis des cellules SW-620 avec une EC_{50} égale à 67,8 μ M, montrant ainsi une certaine sélectivité pour cette lignée. Aucune autre molécule n'est active sur cette lignée. Quatre composés sont modérément cytotoxiques à l'égard des lignées HeLa, HaCat et PC-3 (composés **7g**, **7l**, **11g** et **11j**). Il est à noter que le composé **11j** (JMV5046), meilleur inhibiteur de la KLK7 possède également le meilleur pouvoir cytotoxique à l'égard des lignées HeLa et HaCat avec respectivement des EC_{50} de 24,3 et 30,0 μ M. La meilleure activité a été obtenue sur les lignées HeLa et HaCat, alors que ces dernières ne surexpriment pas la KLK7. Une activité très modérée a été obtenue sur la lignée PC-3 et quasi aucune activité n'a pu être mise en évidence sur la lignée SW-620, alors que ces deux lignées surexpriment la KLK7. A ce stade, il semble donc n'exister aucune corrélation directe entre la cytotoxicité des composés sur ces lignées cancéreuses, et l'inhibition de la KLK7.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que le taux de survie des cellules HEK-293 est supérieur à 50% pour tous les composés testés. Ces résultats semblent indiquer que les composés sont capables d'agir sur les cellules cancéreuses en préservant les cellules saines. Ce travail a été valorisé dans le cadre d'une publication parue dans le journal *Eur. J. Med. Chem.* **93**, 202-213 (2015).

Parallèlement aux travaux sur les dérivés IP-diazépines, nous nous sommes intéressés à l'étude des dérivés quinazolinones qui seront décrits dans le chapitre suivant.

III. ÉTUDE DES DÉRIVÉS QUINAZOLINONES

Dans le cadre d'un criblage de molécules commerciales, notre partenaire biochimiste a identifié un composé de la famille des quinazolinones capable d'inhiber sélectivement la KLK7 avec une IC_{50} de 25,1 μ M.²⁸⁵ La structure de ce composé est représentée dans la Figure III- 12.

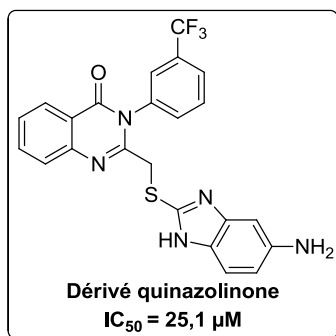


Figure III- 12 : Dérivé quinazolinone issu du criblage de composés commerciaux

Ce dérivé est également un inhibiteur réversible compétitif de la KLK7 comme le JMV5046. Un seul composé de cette famille était disponible commercialement. Afin de déterminer les éléments structuraux indispensables pour l'activité anti-KLK7, nous avons donc entrepris des études de relation structure-activité dans cette série. Nous nous sommes alors proposé d'étudier diverses modulations de la structure du hit quinazolinone. En particulier, divers substituants aliphatiques et aromatiques ont été introduits en position 3 du cycle quinazolinone. La substitution de la partie benzénique de la quinazoline a été envisagée. L'état d'oxydation du soufre, l'alkylation du benzimidazole et la présence de la fonction amine a été également étudiée (Figure III- 13).

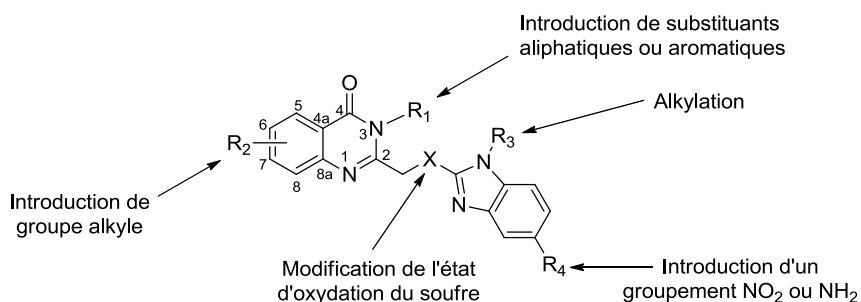


Figure III- 13 : Modulations de la structure du hit quinazolinone envisagées pour les études RSA

Ces études RSA devraient permettre d'accéder *in fine*, à des composés plus actifs vis-à-vis de la KLK7. Dans un premier temps, nous décrirons la synthèse de ces composés. Ensuite, nous présenterons l'évaluation de leur action inhibitrice à l'égard de la KLK7.

III.1. Synthèse des dérivés quinazolinones

La stratégie de synthèse de ces composés a tout d'abord été mise au point. Pour ce faire, l'approche rétrosynthétique suivante a été envisagée. Le dérivé amine peut provenir de la réduction du dérivé nitré correspondant **36**. Celui-ci peut être obtenu par attaque nucléophile du groupement thiol du 2-mercapto-5-nitrobenzimidazole **35** sur un dérivé chlorométhylquinazolinone diversement substitué en position 3, pour conduire après *S*-alkylation, au dérivé thioéther **36**.

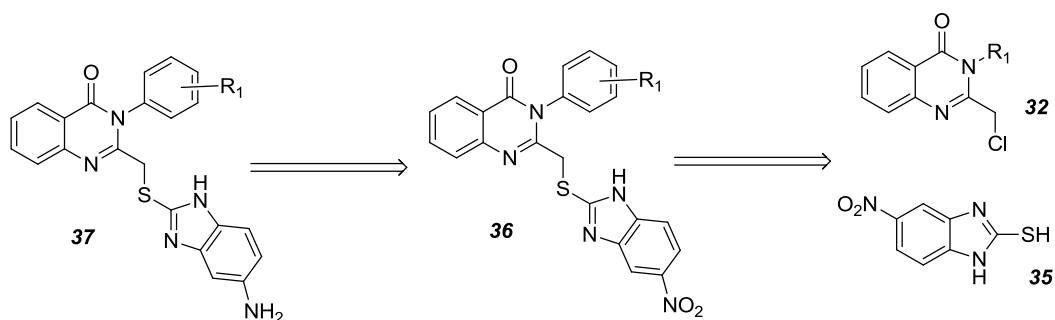


Schéma III- 40 : Schéma rétrosynthétique des quinazolinones ciblées

Le composé 2-mercapto-5-nitrobenzimidazole **35** est disponible dans le commerce. En revanche, le précurseur **32** doit être synthétisé. La synthèse du précurseur **32** a alors été étudiée.

III.1.1.Synthèse de la 2-(chlorométhyl)-3-arylquinazolin-4-one substituée

Les dérivés quinazolinones possédant un groupement chlorométhylène en position 2 ont déjà été décrits dans la littérature. Deux stratégies de synthèse sont rapportées. La synthèse peut être effectuée à partir de l'anhydride isatoïque (stratégie A) ou à partir de l'acide anthranilique (stratégie B).

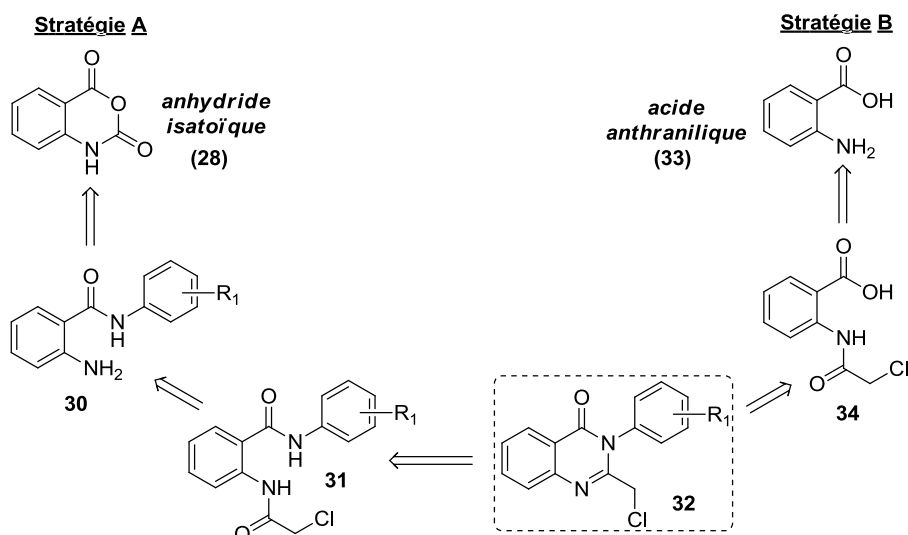


Schéma III- 41 : Stratégies possibles pour accéder au précurseur **32**
Les composés **28** et **33** sont commercialement disponibles.

Selon la stratégie A, le composé **32** peut être obtenu par cyclisation du dérivé *bis*-amide **31**, lui-même issu de l'acylation de l'anthranilamide **30**. Ce dernier peut être obtenu par attaque nucléophile d'une aniline sur l'anhydride isatoïque. Selon la seconde stratégie, la quinazolinone **32** est obtenue par cyclisation du dérivé **34** en présence d'anilines diversement substituées. Le dérivé **34** est obtenu par simple amidification de l'acide anthranilique.

La synthèse des composés **32** a tout d'abord été étudiée en utilisant l'anhydride isatoïque comme composé de départ (Stratégie A).

III.1.1.1. Stratégie A

Ce protocole a été étudié en utilisant l'aniline ($R_1 = H$) comme nucléophile. La séquence réactionnelle est décrite dans le Schéma III- 42. La synthèse du dérivé anthranilamide **30** est effectuée selon une méthode décrite par T. Asano et *al.* en 2004.^{290,291} Elle consiste à faire réagir l'aniline sur l'anhydride isatoïque dans le DMF à chaud. Le dérivé anthranilamide **30** est obtenu avec un rendement de 33% après purification par chromatographie sur gel de silice (éluant AcOEt/Hex 1/5 v/v). Celui-ci est ensuite mis en présence du chlorure de chloroacétyl dans le THF à 0°C, selon une méthode décrite par P. Avinash et *al.* en 2010, pour former l'intermédiaire **31**.²⁹² Ce dernier est isolé avec un rendement de 74% après une purification par colonne chromatographique de gel de silice. Il est ensuite cyclisé en présence d'anhydride acétique à 140°C selon la méthode de P. Avinash et *al.* A la fin de la réaction, le solvant est évaporé et le résidu est repris dans le

dichlorométhane. La solution est lavée avec une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 . La phase organique est séchée sur sulfate anhydre de sodium et condensée sous-vide. L'analyse LC/MS indique la présence du composé **32** attendu de masse molaire égale à 270 g.mol^{-1} mais également de plusieurs autres composés. La purification du produit brut par chromatographie sur gel de silice ($\text{AcOEt/Hex } 1/5, \text{ v/v}$) a entraîné la dégradation du composé désiré. Le composé **32** formé selon cette approche n'a donc pas été isolé.

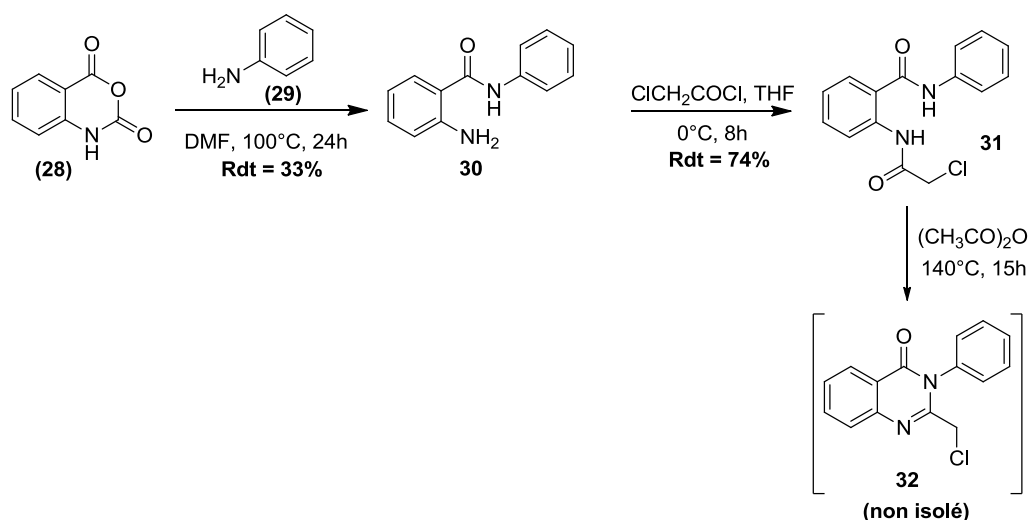


Schéma III- 42 : Synthèse du précurseur **32** selon la stratégie A

L'obtention des composés **32** à partir de l'acide anthranilique a donc été étudiée (Stratégie B).

III.1.1.2. Stratégie B

Cette stratégie de synthèse, décrite par R.S. Giri et *al.* en 2010, débute par la chloro-acétylation des anthranilates **33** avec le chlorure de chloroacétyle en présence d'une base (triéthylamine).²⁹³ L'acide anthranilique non substitué et l'acide 4-méthylanthranilique ont été sélectionnés comme produits de départ. Ils sont successivement mis en réaction avec le chlorure de chloroacétyle dans le dichlorométhane à froid. Le suivi réactionnel est réalisé par CCM ; on observe la formation d'un précipité au fur et à mesure de l'évolution de la réaction. Lorsque le produit de départ est complètement consommé, la suspension est filtrée sur fritté et le précipité est lavé avec une quantité suffisante d'eau. Les dérivés amides **34a** et **34b** sont isolés avec des rendements de 90% et 71% respectivement.

Les intermédiaires acides 2-(2-chloro-acétylamino) benzoïques correspondants **34** sont ensuite traités avec le trichlorure de phosphore (PCl_3) pour être convertis en chlorure d'acyle.

Le chlorure d'acide généré *in situ* réagit avec le dérivé aniline à reflux du toluène, pour conduire aux produits cyclisés **32** (Schéma III- 43).

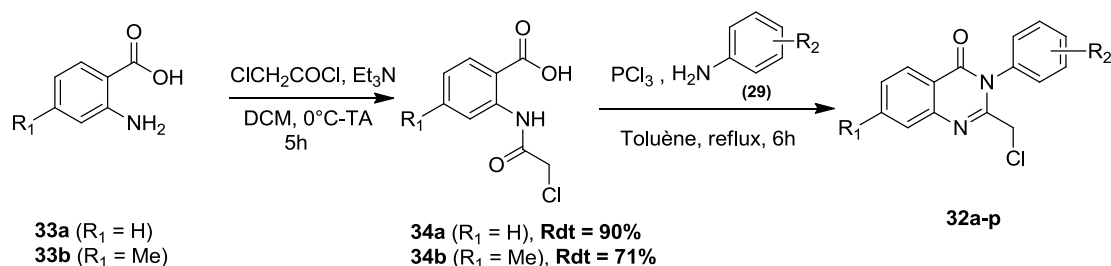


Schéma III- 43 : Synthèse du précurseur **32** selon la stratégie B

Le précurseur **32a** a alors été synthétisé en utilisant initialement la 3-trifluorométhylaniline **29a**, et le dérivé non-substitué **34a** pour la réaction de cyclisation. L'avancement de la réaction est suivi par CCM. A la fin de la réaction, l'analyse LC-MS révèle la présence du produit d'intérêt **32a** majoritairement (ion moléculaire de rapport m/z 339) et de façon minoritaire, d'un second produit de rapport m/z 305 soit une différence de masse de 34 unités. L'analyse du massif isotopique du pic moléculaire montre l'absence d'atome de chlore dans le composé **32a'**. Ce produit secondaire, dont le ratio de formation est inférieur à 5% (déterminé par HPLC), pourrait correspondre au produit cyclisé ayant perdu l'atome de chlore. Une tentative de purification du brut par chromatographie sur colonne n'a pas permis d'isoler le composé **32a'** à cette étape. De plus, on note une dégradation importante du composé **32a**. Ainsi, dans la mesure où le composé **32a** semble instable sur colonne chromatographique, le produit brut obtenu après évaporation du toluène du milieu réactionnel, est utilisé tel quel pour l'étape suivante.

Le mécanisme proposé pour la cyclisation est rapporté dans le Schéma III- 44.

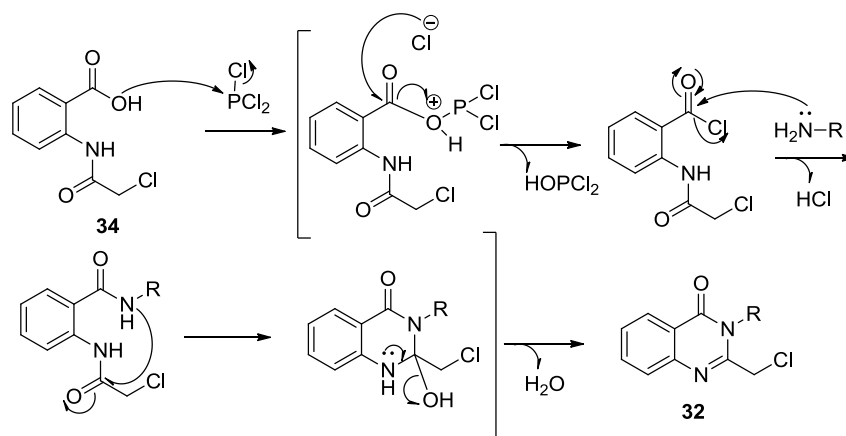
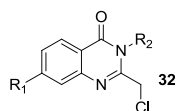


Schéma III- 44 : Mécanisme de cyclisation proposé pour l'obtention du précurseur **32**

La stratégie B a été retenue pour la synthèse du précurseur **32**, et la réaction a alors été étendue à différentes anilines commerciales en utilisant soit l'acide anthranilique non substitué, soit l'acide 4-méthylanthranilique. Nous avons sélectionné des anilines substituées par des groupes méthyle, méthoxy, halogéno ou nitro en position *ortho*, *meta* ou *para* du noyau phényle. L'aniline et la cyclohexylamine ont également été choisies pour étudier l'importance de la substitution du noyau phényle et de l'aromaticité sur l'activité enzymatique. Une aniline disubstituée a été également utilisée.

Les quinazolinones correspondantes **32a-p** ont ainsi été obtenues et isolées avec un rendement brut compris entre 38 et 99% (Tableau III- 13). La formation du produit secondaire a été observée dans tous les cas. L'utilisation d'un autre solvant, l'acétonitrile, n'a pas permis de diminuer significativement la proportion en produit secondaire. Les proportions en produit secondaire sont inférieures à 10% dans le cas des dérivés de l'aniline **32d**, de la 2-méthoxyaniline **32g** et 3-méthylaniline **32f** (6%), de la 4-méthoxyaniline **32i** et 4-trifluorométhylaniline **32c** (8%) et de la 3-méthoxyaniline **32h**. Dans le cas des dérivés portant en position 3 de la quinazolinone, un groupement 3-nitro-4-méthylphényle (**32n**), 3-trifluorométhylphényle (**32a**), 3-cyclohexyle (**32e**), 4-bromophényle (**32l**), la proportion en produit secondaire est assez importante avec respectivement 30, 42, 44 et 49%. La présence d'un groupe méthyle en position 7 pourrait favoriser la formation du produit secondaire. En effet, dans le cas des quinazolinones **32o** et **32p**, la proportion en produit secondaire est beaucoup plus élevée, comparée à celle de leurs analogues non substitués en position 7 (composés **32a** et **32d**). Il est à noter que dans le cas de la quinazolinone **32o**, c'est le produit secondaire qui se forme majoritairement avec un taux de 57% contre 43% pour le produit désiré, contrairement à ce qui a été observé pour tous les autres dérivés.



Composé	R ₁	R ₂	Rdt brut (%)	Ratio 32/Pdt secondaire ^a
32a	H		74	58/42
32b	H		89	87/13
32c	H		89	92/8
32d	H		99	95/5
32e	H		72	56/44
32f	H		94	94/6
32g	H		99	94/6
32h	H		69	91/9
32i	H		77	92/8
32j	H		72	87/13
32k	H		99	80/20
32l	H		99	51/49
32m	H		99	90/10
32n	H		94	70/30
32o	Me		99	43/57
32p	Me		38	72/28

Tableau III- 13 : Rendements de synthèse des composés **32**. ^a Les ratios ont été déterminés après analyse HPLC analytique à 214 nm, et intégration des pics correspondants.

Ces différents intermédiaires ont alors été successivement utilisés pour accéder aux quinazolinones cibles.

III.1.2.Obtention des dérivés quinazolinones cibles

A partir des dérivés 2-(chlorométhyl)-3-aryl-quinazolin-4-one **32**, il est chimiquement possible d'accéder aux dérivés **36** *via* une réaction de substitution nucléophile du groupement chlorométhyle par le 2-mercapto-5-nitrobenzimidazole (composé **35**).

III.1.2.1. Substitution des quinazolinones

Les quinazolines chlorométhylées sont successivement mises en réaction avec le 2-mercapto-5-nitrobenzimidazole, en présence d'une solution de soude 5M dans l'éthanol à température ambiante. Le dérivé thioéther **36** qui en résulte précipite dans le milieu réactionnel et est isolé par simple filtration et lavage à l'éther diéthylique.

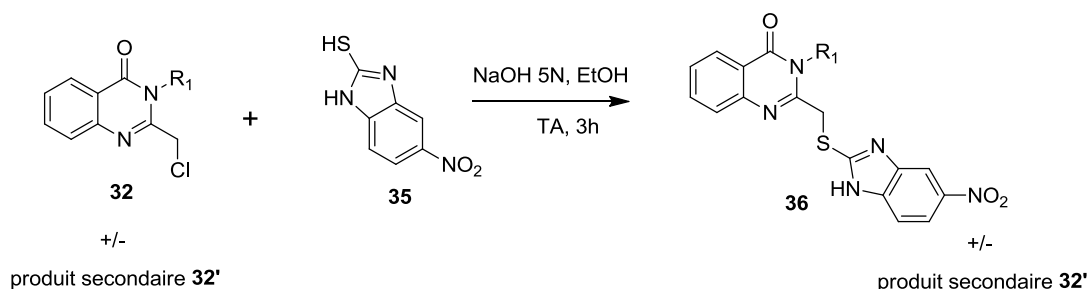


Schéma III- 45 : Obtention des dérivés quinazolinones

Il est à noter que le produit secondaire issu de l'étape de cyclisation s'élimine facilement par filtration, puisque solubilisé dans le filtrat. En vue d'identifier le produit secondaire issu de la réaction de cyclisation avec le dérivé 3-trifluorométhylaniline (composé **32a'**), le brut réactionnel est filtré afin de récupérer le composé **36a**. Puis le filtrat est évaporé à sec. Une purification du résidu par chromatographie sur colonne de gel d'alumine a permis d'isoler le composé **32a'**. Des analyses par spectrométrie RMN (RMN ¹H, RMN ¹³C) ont mis en évidence la présence de signaux à 2,13 ppm et à 24,0 ppm correspondant respectivement aux protons et au carbone d'un groupement méthyle (Cf. spectres RMN, Figure III- 14 et Figure III- 15). Ceci confirme l'hypothèse de la perte de l'atome de chlore, émise suite à l'analyse LC-MS du brut issu de la cyclisation.

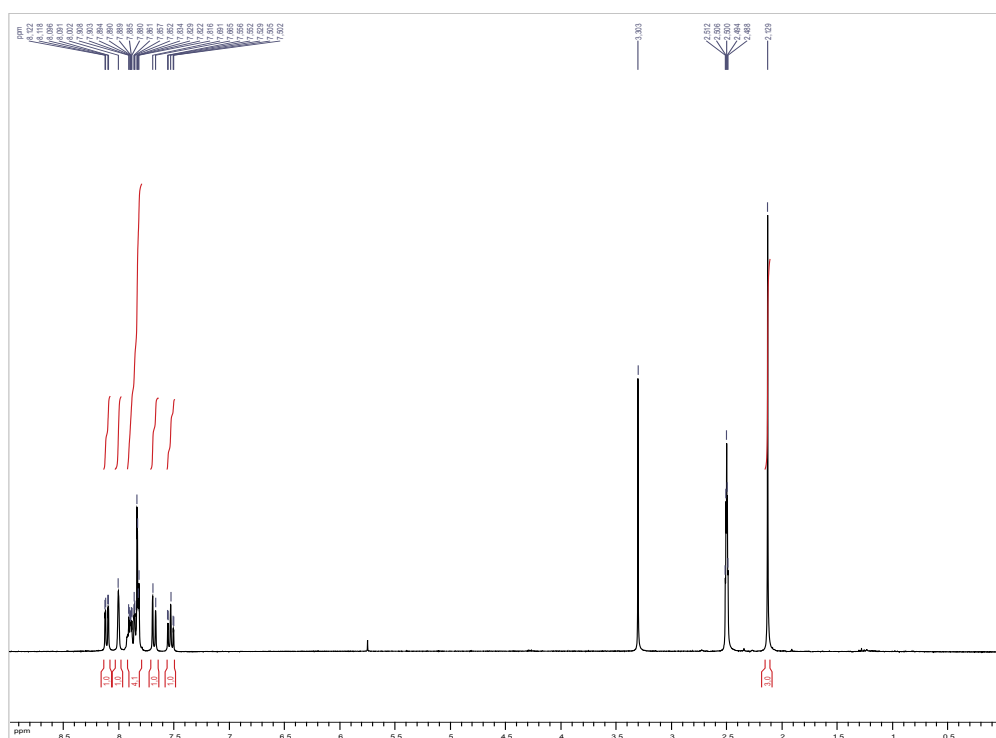
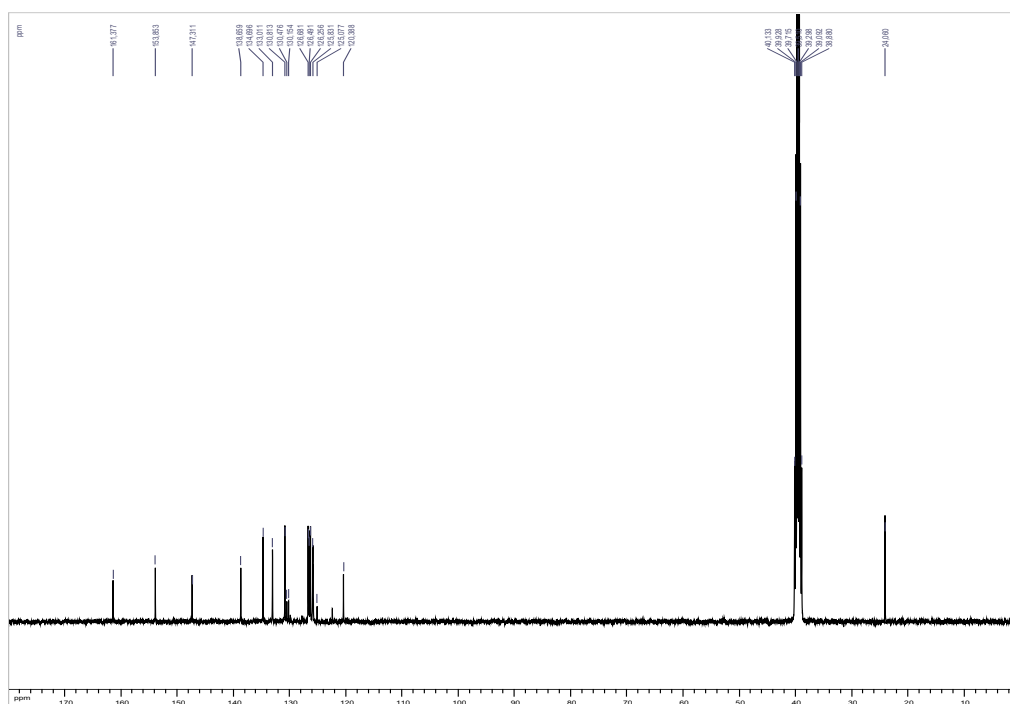


Figure III- 14 : Spectre RMN ^1H du produit secondaire **32a'** (DMSO d_6 , 400 MHz)



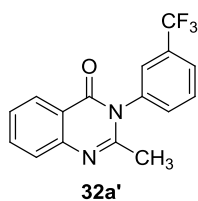
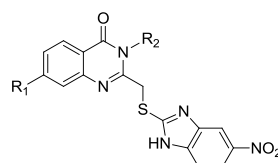


Figure III- 16 : Structure chimique plausible du produit secondaire formé lors de la synthèse de l'intermédiaire **32a'**

Les composés **36a-p** ont alors été obtenus avec des rendements de 21 à 91%.



Composé	R ₁	R ₂	Rdt (%)
36a	H		54
36b	H		82
36c	H		55
36d	H		83
36e	H		21
36f	H		80
36g	H		91
36h	H		65
36i	H		72
36j	H		39
36k	H		45
36l	H		30
36m	H		34
36n	H		68
36o	Me		61
36p	Me		67

Tableau III- 14 : Rendements de synthèse des composés **36**

Les meilleurs rendements sont obtenus avec les quinazolinones dont le noyau phényle en position 3 est non substitué (composé **36d**), ou lorsqu'il porte un méthyle en position *mé*ta (composé **36f**), un groupe *ortho*-trifluorométhyle (composé **36b**) ou *ortho*-méthoxy (composé

36g). Les rendements les plus faibles sont notés avec les quinazolinones **36e** (dérivé de la cyclohexylamine), **36l** (dérivé de la 4-bromo-aniline) et **36m** (dérivé de la 3-chloro-aniline). Il semble n'exister aucune corrélation entre les différences de rendements de synthèse et les propriétés électroniques des substituants portés par le noyau phényle, présent en position 3 de la quinazolinone.

La réduction du groupement nitro des composés **36** permet ensuite d'accéder aux quinazolinones désirées **37**.

III.1.2.2. Réduction des dérivés nitrés **36**

La réduction de la fonction nitro a été étudiée, en utilisant diverses conditions réactionnelles. Les essais de réduction ont été menés sur le dérivé **36a**, afin d'accéder à la quinazoline de référence **37a**, qui avait montré une activité inhibitrice vis-à-vis de la KLK7.

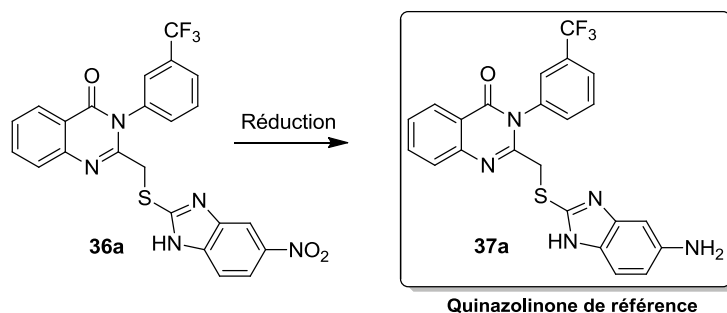


Schéma III- 46 : Synthèse de la quinazolinone de référence **37a**

Les méthodes de réduction utilisant le dithionite de sodium²⁹⁴, le chlorure d'étain dihydraté²⁹⁵, l'hydrogénation catalysée avec du palladium (Pd adsorbé sur BaSO₄)²⁹⁶ ou encore l'acide bromhydrique en présence de la poudre de zinc,²⁹⁷ ont été étudiées. L'utilisation de dithionite de sodium à chaud et du chlorure d'étain dihydraté, permet de convertir totalement de composé nitré et conduisent au composé **37a** attendu. L'utilisation de chlorure d'étain permet d'obtenir le composé **37a** avec une meilleure pureté (plus de 96% avant purification).

Dans les deux autres cas, la réaction n'aboutit pas au produit **37a** désiré. L'analyse LC-MS révèle la présence de deux composés dont l'un possède une masse molaire de 304 ($[M+H]^+ = 305$) et le second, une masse molaire égale à 165. L'ion moléculaire de masse 305 peut correspondre au produit secondaire **32a'** observé lors de la synthèse du dérivé **36a**. L'ion

de masse molaire 165 pourrait correspondre au motif mercaptobenzimidazole dont le groupement nitro a été réduit (composé **38**) comme illustré ci-après (Schéma III- 47).

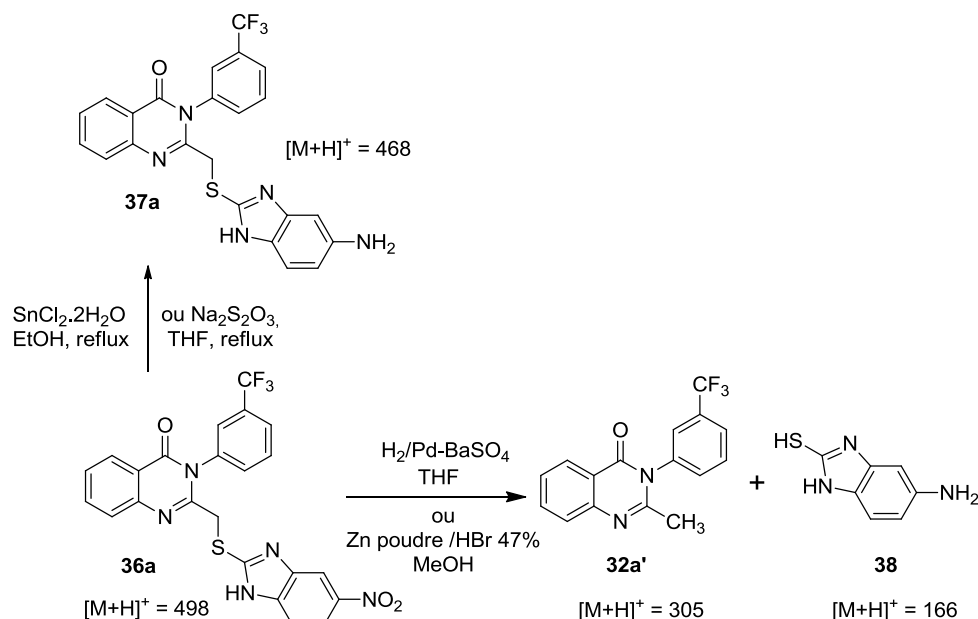
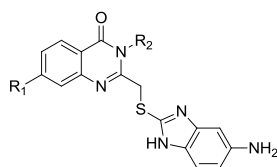


Schéma III- 47 : Étude des conditions de réduction du dérivé **36a**

Il ressort de cette étude que les réducteurs de choix sont le dithionite de sodium et le chlorure d'étain dihydraté, ce dernier restant la meilleure alternative. Le chlorure d'étain dihydraté a donc été retenu comme méthode de réduction et cette méthode a été appliquée à l'ensemble des dérivés nitrés **36**. Après purification sur colonne chromatographique de gel de silice, les composés **37** sont finalement isolés avec des rendements compris entre 50 et 93%. Les composés obtenus sont rapportés dans le Tableau III- 15.

Il est à noter que dans le cas du dérivé **36n** qui possède deux groupements nitrés, les conditions réactionnelles utilisées conduisent à la réduction simultanée des 2 fonctions nitrées pour donner le composé diamine **37n**.



Composé	R ₁	R ₂	Rdt (%)
32a	H		91
37b	H		53
37c	H		53
37d	H		97
37e	H		75
37f	H		54
37g	H		62
37h	H		64
37i	H		91
37j	H		50
37k	H		77
37l	H		59
37m	H		74
37n	H		63
37o	Me		65
37p	Me		82

Tableau III- 15 : Rendements de synthèse des composés **37**

La modulation de la « partie benzimidazole » a ensuite été entreprise. Deux modulations ont été étudiées : la méthylation de l'azote *N*-1 du noyau benzimidazole et l'oxydation de l'atome de soufre du lien thiométhylène.

III.1.2.3. Méthylation du *N*-1 benzimidazolique

Pour introduire un groupement méthyle sur l'atome d'azote *N*-1 du motif benzimidazole, nous avons effectué la réaction de méthylation sur le dérivé **36a** en utilisant l'iodure de méthyle (CH₃I) en présence du *tert*-butylate de sodium (*t*-BuONa). L'avancement de la réaction est suivi par CCM et HPLC. L'analyse LC-MS révèle la présence de deux

composés de temps de rétention très proche et de masse molaire égale à 511 g.mol⁻¹. Ces deux composés sont probablement issus de la méthylation du *N*-1 et du *N*-3 du noyau benzimidazole, en raison de la prototropie existant dans ce noyau hétérocyclique. A la fin de la réaction, l'excès de base est "neutralisé" par ajout de saumure au milieu réactionnel, puis le produit est extrait au dichlorométhane. Les phases organiques sont collectées, séchées sur sulfate de sodium, filtrées et condensées sous pression réduite. Les dérivés *N*-méthyle **40a** et **40b** n'ont pas pu être séparés et sont obtenus après purification par colonne chromatographique d'alumine, avec un rendement de 40%. L'analyse RMN ¹H confirme la présence des deux composés isomères. Le mélange des dérivés *N*-méthylés est ensuite réduit avec le chlorure d'étain en milieu éthanolique pour donner les dérivés quinazolinone *N*-méthyle **41a** et **41b**, qui n'ont pas pu être séparés.

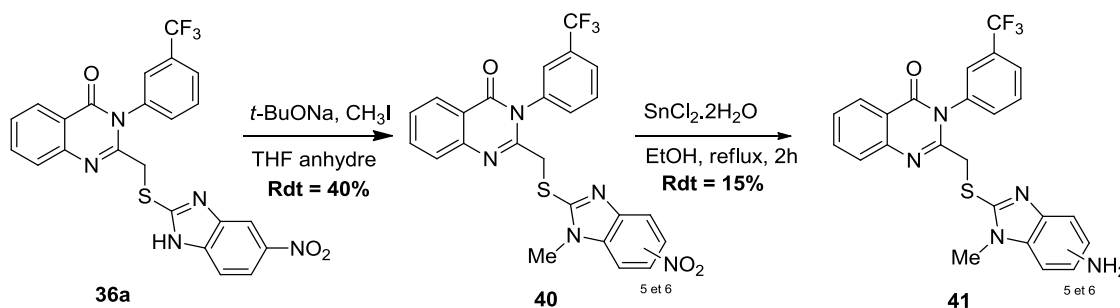


Schéma III- 48 : Synthèse du dérivé quinazolinone *N*-méthyle **41**

III.1.2.4. Synthèse du dérivé sulfoxyde

Il est chimiquement possible de transformer un dérivé thioéther en dérivé sulfoxyde qui lui-même peut être facilement converti en sulfone. De nombreuses méthodes, permettant d'oxyder les dérivés thioéthers en sulfoxydes ou en sulfones, sont rapportées dans la littérature. Par exemple, M. M. Khodaei et *al.* ont décrit ce type de transformation en ayant recours à des méthodes utilisant le peroxyde d'hydrogène en présence d'anhydride trifluorométhane sulfonique (Tf₂O)²⁹⁸ ou d'oxychlorure de phosphore (POCl₃).²⁹⁹

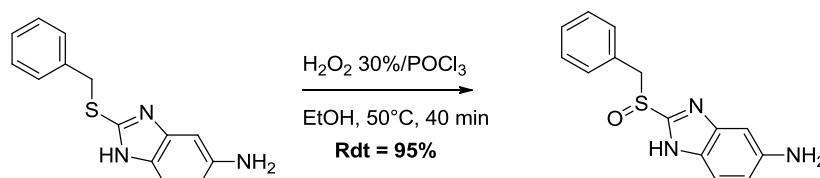
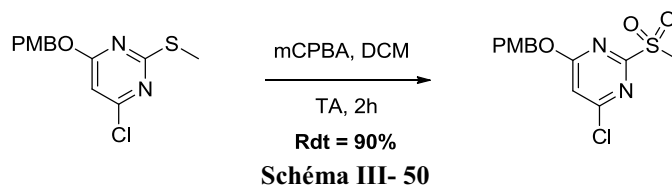


Schéma III- 49

C.V. Cee et *al.* quant à eux, ont décrit l'utilisation de l'acide *meta*-chloroperbenzoïque (*m*-CPBA) pour ce type de réaction³⁰⁰.



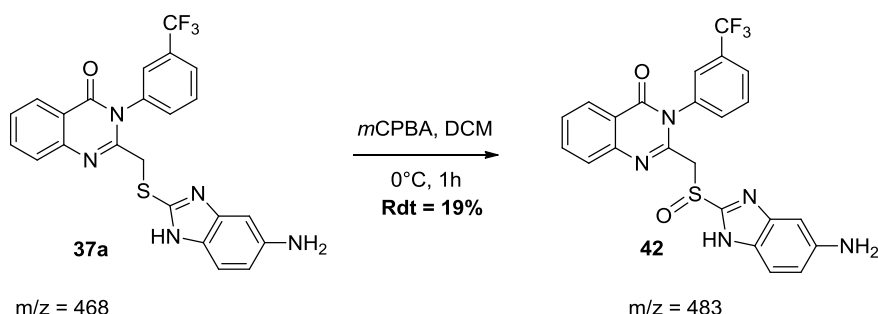
Ces trois protocoles ont alors été testés pour l'oxydation du dérivé thioéther **37a**. Les différentes conditions utilisées sont repertoriées dans le Tableau III- 16.

Conditions	Réactifs	Solvant	Température	Durée
A	H ₂ O ₂ , Tf ₂ O	EtOH	TA puis 40°C	5h (TA) puis 1 nuit (40°C)
B	H ₂ O ₂ 30%, POCl ₃	EtOH	50°C	16h
C	<i>m</i> CPBA	DCM	0°C	1h

Tableau III- 16 : Conditions d'oxydation étudiées pour l'obtention du dérivé sulfoxyde **42**

Les premiers essais effectués dans les conditions réactionnelles utilisant le peroxyde d'oxygène n'ont pas permis d'obtenir le composé **42** attendu. Dans les conditions A, il n'y a aucune réaction, seul le produit de départ **37a** est récupéré. Dans les conditions réactionnelles B, on observe une dégradation du composé **37a**, conduisant à un mélange complexe de produits qui n'ont pas pu être identifiés.

Finalement, le dérivé sulfoxyde **42** désiré a pu être obtenu en utilisant l'acide 3-chloroperbenzoïque (*m*-CPBA) dans le dichlorométhane à froid (Schéma III- 51). Au bout d'une heure, la totalité du composé **37a** est consommée, et seul le dérivé de mono-oxydation est détecté par analyse LC-MS. Finalement, celui-ci est isolé après purification par colonne chromatographique d'alumine (éluant DCM/EtOH 5%) avec un rendement de 19%.



L'ensemble des composés synthétisés ont fait alors l'objet d'une évaluation de leur activité inhibitrice sur KLK7, dans les conditions classiques de cinétique enzymatique.

III.2. Étude de l'activité enzymatique des composés

Le dérivé quinazolinone **37a**, correspondant à la structure du hit issu du criblage (Figure III- 12) a été testé sur la KLK7. Une IC_{50} de 24,0 μ M a été mesurée. Celle-ci est similaire à la valeur trouvée lors du criblage de la molécule commerciale (IC_{50} de 25,1 μ M). Des études de docking ont été réalisées sur le dérivé quinazolinone **37a** et la KLK7 en utilisant *Molegro Virtual Docker*, et la structure PDB 2QXH.

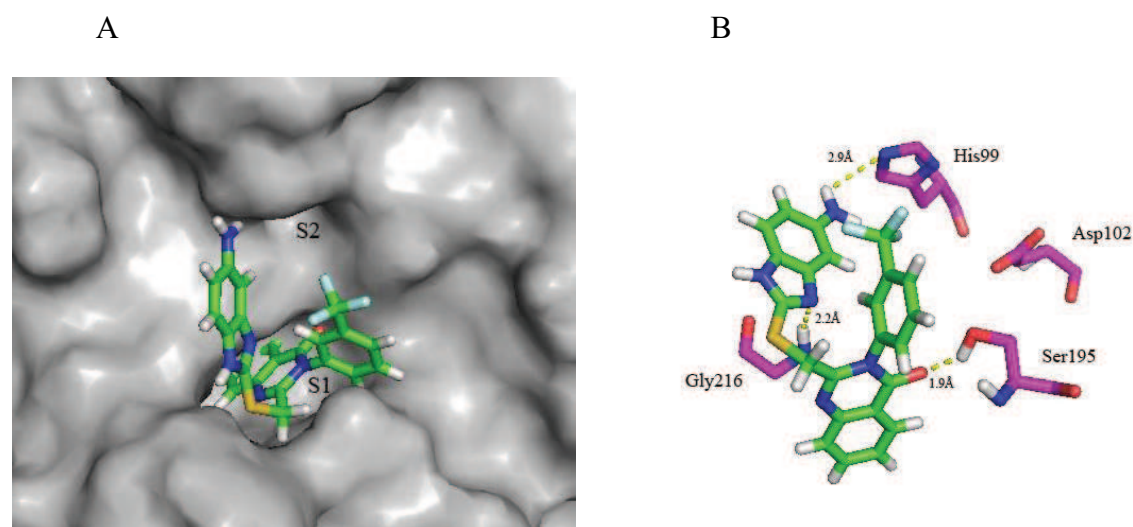


Figure III- 17 : Prédiction du mode de liaison de la quinazolinone **37a** dans le site actif de la KLK7
A- Positionnement hypothétique du composé **37a** dans le site actif de la protéase. **B-** Interactions du composé **37a** avec certains résidus de KLK7. La surface de l'enzyme est colorée en gris. Les acides aminés de la triade catalytique et ceux impliqués dans l'interaction avec l'inhibiteur sont représentés en magenta. Les possibles liaisons hydrogène sont représentées en pointillés jaunes. L'inhibiteur est représenté en vert.

D'après la meilleure pose obtenue entre la protéase et l'inhibiteur, trois liaisons hydrogène s'établissent entre l'inhibiteur et la KLK7. Le noyau quinazolinone occupe la poche S1 de l'enzyme (Figure III- 17A), l'oxygène de la quinazolinone établissant une liaison hydrogène avec la chaîne latérale de la sérine catalytique 195 (distance d'environ 2 Å). Cette fonction a donc été conservée dans l'ensemble des dérivés synthétisés.

A la fois, la partie quinazolinone et la partie benzimidazole semblent importantes pour établir des interactions avec la protéase. Dans le but d'étudier l'implication relative de ces deux éléments dans l'inhibition de la KLK7, nous avons souhaité tester une quinazolinone ne

possédant pas la partie benzimidazole d'une part (composé **32a'**) et un dérivé 5-amino-benzimidazole, d'autre part (composé **39**).

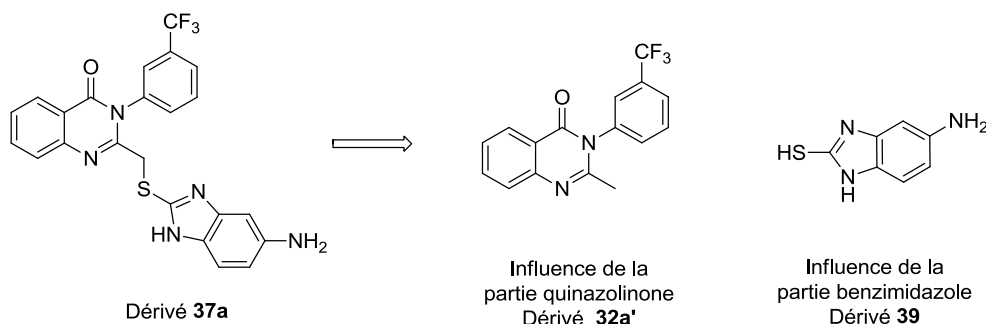


Figure III- 18

Le composé quinazolinone non substitué **32a'** ayant été déjà isolé comme produit secondaire lors de la réaction de cyclisation, le dérivé 5-amino-2-mercapto-benzimidazole a été synthétisé selon la méthode de J. Deng.³⁰¹ Le groupement nitro du dérivé 2-mercapto-5-nitrobenzimidazole **35** est réduit par de l'hydrogène naissant, issu de la réaction entre de l'acide chlorhydrique aqueux sur de la poudre de zinc (Schéma III- 52). Le composé **39** est isolé avec un rendement de 89% après filtration et élimination du solvant du milieu réactionnel.

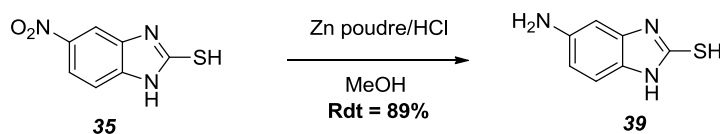


Schéma III- 52 : Réduction du composé 35

Les composés **32a'** et **39** n'ont pas montré d'activité vis-à-vis de KLK7, ce qui confirme l'importance de ces deux éléments pour l'action inhibitrice.

La partie benzimidazole de l'inhibiteur semble établir quant à elle deux liaisons hydrogène (Figure III- 17B). La première interaction implique l'amine primaire de la position 5 du noyau benzimidazole et l'histidine 99 de la triade catalytique (distance d'environ 3 Å) et la seconde, le N-3 du noyau benzimidazole et le NH de la glycine 216 (distance d'environ 2 Å). Le dérivé nitré **36a**, précurseur du hit initial a été testé afin de déterminer l'importance de l'amine primaire. Comme attendu, aucune activité vis-à-vis de la KLK7 n'a été mise en évidence, prouvant de ce fait, l'importance de la fonction amine pour l'interaction avec la protéase. De même, le dérivé *N*-méthyl-benzimidazole **41** ne possède pas d'activité

inhibitrice. Ceci semble donc confirmer l'établissement de la liaison hydrogène entre le *N*-3 du benzimidazole et la glycine 216, et suggère par ailleurs que la méthylation aurait lieu sur le *N*-3 du motif benzimidazole.

Les composés possédant un méthyle en position 7 du noyau quinazolinone (dérivés **37n** et **37o**) sont également dépourvus d'activité inhibitrice. D'après les études de docking, le noyau quinazolinone occupe la poche S1. La présence du reste méthyle en position 7 pourrait générer de l'encombrement stérique, notamment au voisinage de l'asparagine Asn 189 présente au fond de la poche S1, perturbant de ce fait l'établissement des interactions entre l'inhibiteur et la protéase.

D'après le docking, le noyau 3-trifluorométhyl-phényle semblent se situer à l'entrée de la poche S1 et ne semble pas établir d'interactions directes avec la protéase. Des modulations semblent alors possibles. Malheureusement, quelques soient les modifications apportées en cette position, aucune inhibition significative n'a pu être mise en évidence. La suppression de l'aromaticité en position 3 de la quinazolinone abolit l'action inhibitrice (composé **37e**). Le groupement trifluorométhyle en *meta* du noyau phényle est crucial à l'activité. En effet, la suppression de ce groupement (composé phényle **37d**) ou le déplacement du groupement CF₃ en position *ortho* ou *para* conduisent à la suppression de l'activité (composés **37b** et **37c**). De même, un méthyle en lieu et place du CF₃ entraîne également une perte de l'activité (composé **37f**). De plus, le remplacement du groupement CF₃ par un groupement méthoxy, un atome de brome, de chlore, ou une amine primaire conduit à une perte de l'activité, quelque soit la position du substituant (composés **37g-n**). Enfin, le dérivé sulfoxyde (dérivé **42**) est également inactif. Le lien thioéther semble important pour orienter convenablement l'inhibiteur dans le site actif de l'enzyme.

➤ Conclusion

A partir d'un criblage de molécules commerciales, un dérivé quinazolinone avait été identifié par notre partenaire biochimiste, comme un inhibiteur de la KLK7 avec une IC₅₀ de 25,1 µM. Un protocole simple et efficace permettant la conception de ce type de dérivés, a été mis au point dans notre laboratoire. Ce protocole a permis la synthèse du hit initial et l'accès à une librairie de composés, développés dans le cadre d'une étude de relations structure - activité. L'activité du hit initial a été confirmée. Cependant, aucun composé issu de la

modulation de ce hit n'a montré une quelconque activité sur la KLK7. Ce composé semble donc difficilement modifiable pour envisager augmenter son activité inhibitrice. Il est toutefois à noter que la partie benzénique de la quinazoline n'a été étudiée que partiellement. Seuls deux dérivés possédant un méthyle en position 7 ont été synthétisés et évalués. D'après les études de docking effectuées avec le composé **37a**, il semble que la partie quinazolinone de l'inhibiteur occupe la poche S1 de l'enzyme, la position 7 pointant vers le fond de la poche enzymatique occupée par l'asparagine Asn189 (distance d'environ 3 Å). Ce positionnement de l'inhibiteur pourrait être mis à profit pour établir une liaison hydrogène supplémentaire entre l'inhibiteur et les résidus de la poche S1, et en particulier avec l'Asn189. Ainsi, des dérivés pyridopyrimidones convenablement substitués pourraient s'avérer intéressants à étudier.

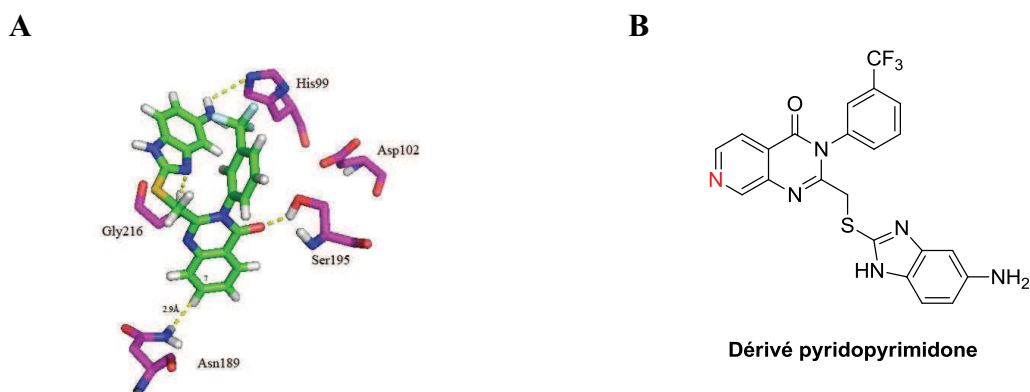


Figure III- 19 : **A.** Position hypothétique de l'Asn189 par rapport à l'inhibiteur **37a**. La distance entre le C-7 de la quinazolinone et l'Asn189 est de 2,9 Å ; **B.** Dérivé pyridopyrimidone à étudier.

Dans le but d'accéder à des inhibiteurs sélectifs et réversibles de KLK7, deux séries de composés ont été explorées. La première est issue d'un criblage de molécules pyrido-imidazodiazépinones qui a permis d'identifier un premier hit, le JMV4967. Ce premier hit a conduit, suite à une étude de relation structure-activité, à la découverte du JMV5046 qui possède une meilleure activité que le hit initial. La seconde série a été développée à partir d'une quinazoline substituée par un amino-benzimidazole, identifiée par notre partenaire biochimiste, suite à un criblage de molécules commerciales. Cependant, les différentes modulations étudiées dans cette série ont conduit à une perte de l'activité du hit initial. Les meilleurs résultats ont donc été obtenus dans la série des dérivés diazépiniques. Ainsi, en vue d'accéder à des inhibiteurs plus puissants que les composés déjà identifiés, nous avons souhaité poursuivre l'étude des dérivés diazépiniques. Des études de réactivité chimique ont

alors été entreprises, afin d'accéder à deux nouvelles séries de composés diazépines fusionnés avec l'IP ou l'indole :

- des dérivés IP-[1,3]diazépines obtenus à partir de la 2-amino-IP *via* une alkylation sélective de la position 3 du cycle, selon une approche d'addition de Michael ;
- des dérivés indolo[1,4]diazépines, obtenus en appliquant au 2-amino-indole, la réaction d'acylation déjà étudiée avec l'IP.

L'étude des dérivés IP-[1,3]diazépines dont la synthèse fait intervenir une étape d'addition de Michael sera abordée dans un premier temps.

IV. ÉTUDE DE LA SYNTHÈSE DE DÉRIVÉS IP-[1,3]DIAZÉPINES *VIA* L'ADDITION DE MICHAEL

Nous avons évoqué précédemment qu'il était possible d'acyler sélectivement la position 3 de la 2-amino-IP dans des conditions réactionnelles douces, démontrant la grande réactivité de ce synthon (Partie II, section III-3). Encouragés par cette observation, nous avons étudié la réactivité de la 2-amino-IP dans le cadre de la réaction de nitro-Michael. Le but est d'utiliser ensuite les produits d'addition de Michael ainsi formés, pour accéder à une famille originale de composés IP-[1,3]diazépines, après réduction de la fonction nitro et cyclisation/oxydation de la diamine intermédiaire. Cela devrait permettre d'accéder *in fine*, à des dérivés pyrido-imidazo-1,3-diazépinones, dont la position 5 du cycle diazépique est substituée par un groupe alkyle ou aryle (Schéma III- 53). Cette nouvelle famille pourra alors faire l'objet d'une évaluation de ses potentialités inhibitrices vis-à-vis de la K_{KLK7}.

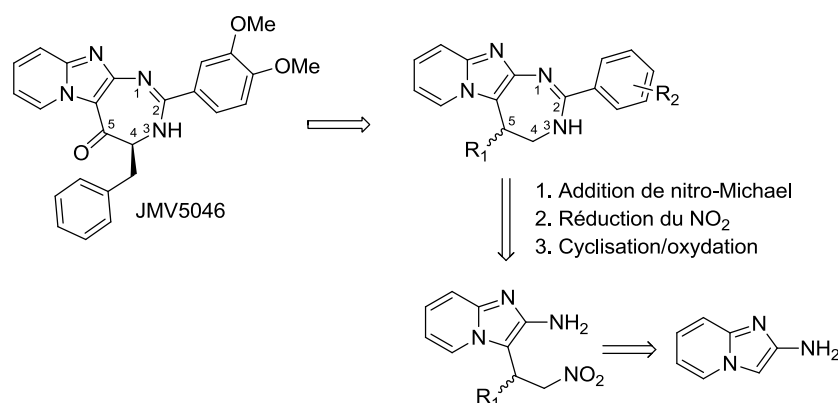


Schéma III- 53

Tout d'abord, nous décrivons l'étude de la réaction de nitro-Michael sur le synthon 2-amino-IP. L'accès aux composés diazépiniques cibles sera ensuite présenté.

IV.1. Étude de la réaction de nitro-Michael sur la 2-aminoIP

La réaction de Michael ou l'addition de Michael est une réaction d'addition d'un nucléophile (carbanion ou autre nucléophile) sur un composé carbonyle α,β -insaturé. L'entité nucléophile est appelée donneur de Michael et l'électrophile est appelé accepteur de Michael.³⁰² Cette réaction a été utilisée et étendue à plusieurs types d'accepteurs. Nous nous sommes intéressés particulièrement aux réactions dont l'accepteur de Michael est un dérivé nitrooléfine. On parle dans ce cas de réaction de nitro-Michael.

Ce type de réaction a fait l'objet d'études dans le cas d'hétérocycles riches en électrons tels que le pyrrole et l'indole. Par exemple, L. Chunchi et *al.* ont décrit en 2005 la synthèse de dérivés 2-pyrrolyl-2-aryl-1-nitroalcane **48** et de 2-indolyl-2-aryl-nitroalcane **49** à partir de pyrrole ou d'indole et de dérivés β -nitrostyrène. La réaction a lieu en présence d'iode catalytique, et permet d'obtenir le dérivé d'addition avec de bons rendements.³⁰³

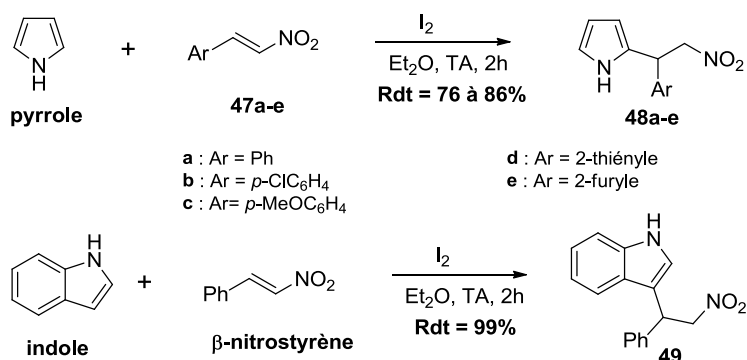


Schéma III- 54 : Exemples de réactions de nitro-Michael sur le pyrrole et l'indole

En revanche, la réactivité de l'IP dans le cadre de l'addition de Michael, n'est pas rapportée dans la littérature à notre connaissance. L'IP est un aza analogue de l'indole dont la position 3 est enrichie en électrons. Dès lors, ce système hétérocyclique est susceptible de se comporter comme un donneur de Michael. Nous avons donc décidé d'étudier plus précisément la réactivité de la 2-amino-IP dans le cadre de l'addition de nitro-michael. On pourrait en effet, imaginer qu'une réaction entre la 2-amino-IP et un dérivé nitroalcène puisse conduire à des composés 3-nitro-alkylimidazo[1,2-*a*]pyridines selon le schéma réactionnel suivant.

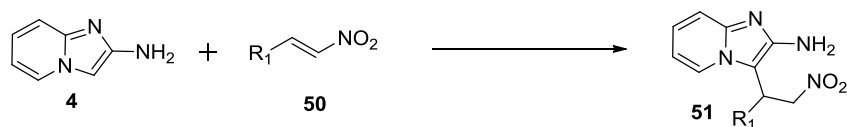


Schéma III- 55

La faisabilité de cette réaction a été étudiée en utilisant le *trans*-β-nitrostyrène comme accepteur de Michael. Dans un premier essai, le dérivé trifluoroacétamide **3** a été déprotégé comme décrit dans la section II.2. La 2-amino-IP **4** obtenue étant peu stable, elle est immédiatement mise en réaction après extraction, avec 1 équivalent de *trans*-β-nitrostyrène dans le dichlorométhane à 0°C. La 2-amino-IP **4** et le dérivé nitré sont consommés très rapidement. L'analyse LC-MS du brut révèle la présence d'un produit de mono-addition et de deux produits de double-addition.

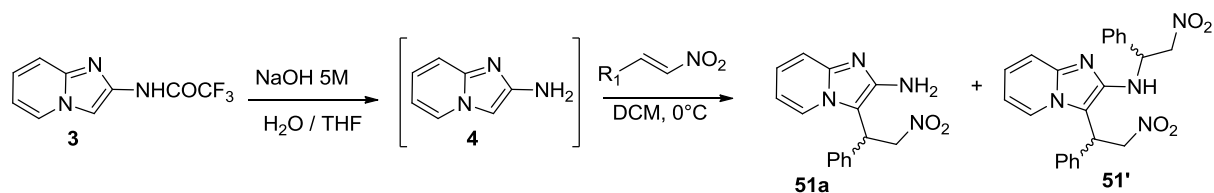


Schéma III- 56

Le brut réactionnel a alors été purifié par chromatographie sur gel de silice. La première fraction d'élution correspond aux produits di-alkylés qui n'ont pas pu être séparés (composés **51'**). La seconde élution donne le composé **51a**, produit de mono-alkylation, qui est isolé avec un rendement de 20%.

Des expériences RMN ont été effectuées sur le produit **51a** afin de déterminer la position d'alkylation. En effet, une *N*- ou une *C*-3 alkylation sont envisageables pour cette réaction. Le spectre RMN ^1H indique l'absence du signal correspondant au proton porté par le carbone 3, suggérant ainsi que l'alkylation a lieu sur cette position (*Cf.* spectre RMN, Figure III- 20). De plus, on note la présence d'un singulet élargi à 3,90 ppm correspondant à la fonction amine primaire. L'ensemble de ces éléments permettent de prouver que le composé **51a** correspond au produit de C3-alkylation.

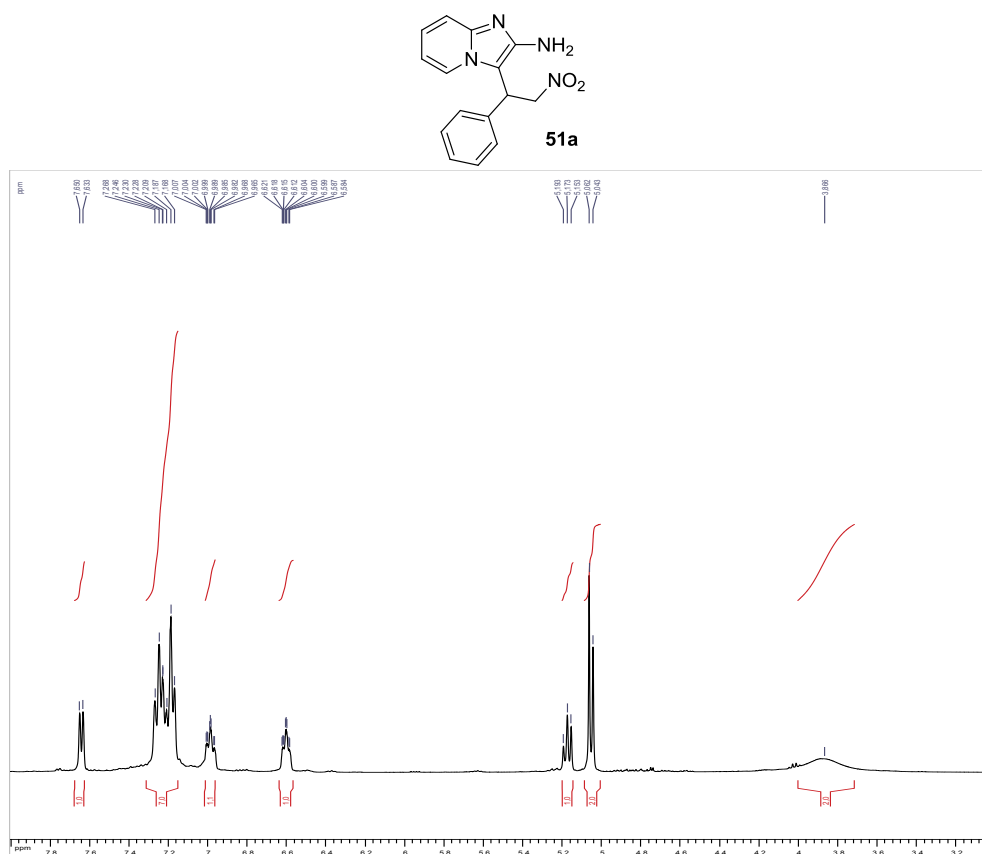


Figure III- 20 : Spectre RMN¹H du composé **51a** (zoom entre 3 et 8 ppm)

Les dérivés de dialkylation ont également fait l'objet d'une étude structurale. L'analyse des spectres RMN ¹H et ¹³C montrent que les composés **51'** correspondent aux deux diastéréoisomères issus d'une double C3 et N- alkylation. Ainsi, contrairement à ce qui avait été observé dans le cas des dérivés C3-acylés (Cf. section II.2., Partie III) où la réactivité de l'amine primaire en position 2 du cycle IP était faible, l'amine primaire reste réactive dans le cas des dérivés C-3 alkylés, conduisant alors à une double alkylation.

Afin d'obtenir uniquement le produit de mono-alkylation **51a**, les quantités de nitro-alcène utilisées ont été réduites. Ainsi, l'utilisation de 0,5 équivalent de nitrostyrène par rapport aux quantités de dérivé trifluoroacétamide **3**, conduit exclusivement au composé de mono-addition. Les conditions réactionnelles sont résumées dans le Tableau III- 17.

Désignation	Composé 3 (équiv.)	Nitrostyrène (équiv.)	T (°C)	Solvant	51a (rdt)	51' (rdt)
Conditions A	1	1	0	DCM	20	44
Conditions B	1	0,5	0	DCM	95	-
Conditions C	1	0,5	-60	DCM	95	-

Tableau III- 17 : Étude de l'addition de nitro-Michael sur la 2-aminoIP

Le produit formé dans les conditions réactionnelles B a été isolé avec un rendement de 95% (composé **51a**) après une purification par colonne chromatographique sur gel de silice, en utilisant comme éluant un mélange d'acétate d'éthyle et de *n*-hexane (3/7 ; v/v). Ces résultats ont permis de prouver que la réaction de nitro-Michael pouvait être menée sur le noyau IP, ce qui n'a jusqu'à présent jamais été rapporté dans la littérature. Il est à signaler que l'abaissement de la température de la réaction (conditions C), ne modifie pas le rendement en produit **51a** et que la vitesse de la réaction est sensiblement identique à celle des conditions B, la réaction étant totale entre 15 minutes et 1 heure à -60°C, comme à 0°C. Les conditions B ont été ainsi retenues comme conditions optimales pour cette réaction. De plus, contrairement aux dérivés de l'indole et du pyrrole, elle ne nécessite pas d'activation particulière pour fonctionner. La réaction étant optimisée, une exemplification a été entreprise en utilisant d'autres dérivés nitrooléfines. Ces dérivés ont été tout d'abord synthétisés, car ils ne sont pas disponibles commercialement.

IV.1.1.Synthèse des dérivés nitroalcènes

La synthèse des dérivés nitrooléfines a été réalisée selon une méthode décrite en 2009 par P. Cheng et *al.*³⁰⁴ Elle consiste à faire réagir un dérivé aldéhydique aromatique **52** avec un large excès de nitrométhane **53** en présence d'acétate d'ammonium à une température de 100°C. Le nitrométhane sert à la fois de réactif et de solvant de réaction. Différents benzaldéhydes substitués en position *para* ont été utilisés comme produit de départ. Ainsi, les composés possédant un groupement inducteur (composé **50b**), mésomère donneur (composé **50c**), fortement électro-attracteur (composé **50d**), un atome d'halogène (composé **50e**) ou un hétérocycle (composé **50f**) ont été successivement mis en réaction.

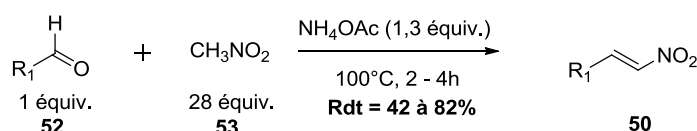


Schéma III- 57 : Synthèse des nitro-oléfines **50**

Après consommation de l'aldéhyde **52**, le nitrométhane est évaporé et le résidu est repris dans du dichlorométhane. La solution est successivement lavée avec de la saumure et de l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, filtrée et condensée sous pression réduite. Après une purification par chromatographie sur colonne de gel de silice

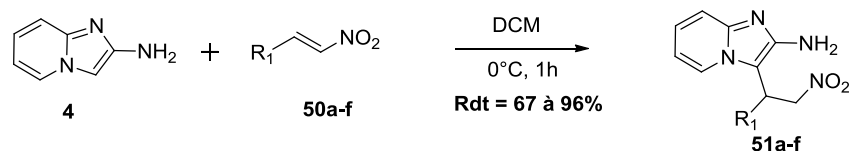
(AcOEt/Ether de pétrole 2 /8 v/v), les dérivés nitro-oléfines correspondants **50** sont isolés avec des rendements allant de 42 à 82%. Les composés isolés sont rapportés dans le Tableau III- 18. Les meilleurs rendements ont été obtenus dans le cas des composés possédant un groupement inducteur et mésomère donneur (composés **50b** et **50c**). Les trois autres dérivés sont obtenus avec des rendements plus faibles, le dérivé trifluorométhyle donne le plus faible rendement, indiquant que la présence de ce groupement fortement électro-attracteur est défavorable pour la réaction.

$\text{R}_1-\text{CH}=\text{CH}-\text{NO}_2$		
Composé	R ₁	Rdt (%)
50b	<i>p</i> -MeC ₆ H ₄	77
50c	<i>p</i> -MeOC ₆ H ₄	82
50d	<i>p</i> -CF ₃ C ₆ H ₄	42
50e	<i>p</i> -BrC ₆ H ₄	57
50f	2-Furyle	58

Tableau III- 18 : Dérivés nitrooléfines synthétisés

➤ **Exemplification de l'addition de nitro-Michael sur la 2-amino-IP**

Les dérivés nitro-oléfines obtenus ont été ensuite successivement mis en réaction avec la 2-amino-IP dans les conditions réactionnelles mises au point précédemment. Ceci a conduit à la synthèse d'une librairie de produits d'addition de nitro-Michael **51b-f**. Les produits ont été isolés après chromatographie avec des rendements de 76 à 96% (Tableau III- 19).



Composé	R ₁	Rdt (%)
51a	Ph	95
51b	<i>p</i> -MeC ₆ H ₄	85
51c	<i>p</i> -MeOC ₆ H ₄	90
51d	<i>p</i> -CF ₃ C ₆ H ₄	67
51e	<i>p</i> -BrC ₆ H ₄	96
51f	2-Furyle	76

Tableau III- 19

La présence de groupements mésomères donneurs (composé **51c** et **51e**) ou inducteur (composé **51b**) ou modérément électro-attracteur (composé **51e**) en position *para* du cycle

aromatique du nitroalcène conduit aux nitro-styrènes correspondants avec des rendements élevés, comparables au rendement obtenu avec le dérivé non-substitué (composé **51a**). La présence d'un groupement fortement électro-attracteur comme le CF₃ entraîne une baisse de rendement. Cette réaction est également compatible avec la présence d'un noyau furane et permet d'obtenir le produit d'addition avec un rendement satisfaisant de 76% (composé **51f**).

A partir des produits d'addition de nitro-Michael ainsi préparés, il est possible d'accéder à des dérivés IP-diazépiniques après une réduction de leur groupement nitro.

IV.1.2. Réduction des composés nitrés

Pour réaliser la réduction du groupement nitro, deux conditions ont été étudiées : une réduction par hydrogénation en présence de palladium sur charbon actif et une réduction par le borohydrure de nickel Ni(BH₄)₂.

L'hydrogénation catalysée par du palladium sur charbon a été étudiée en premier. Pour cette réaction, il a fallu penser à un moyen de réduire le groupe nitro sans réduire le bicycle imidazopyridine. En effet, il est connu que le noyau pyridine de l'IP peut être réduit dans certaines conditions d'hydrogénation catalytique.³⁰⁵ A ce titre, l'ajout d'un alcène « sacrificiel » dans le milieu réactionnel a été envisagé. En effet, l'ajout d'une molécule à la réactivité intermédiaire entre le groupe nitro, à réduire, et le cycle aromatique, à ne pas toucher, devrait en principe permettre de préserver le cycle.

La réduction du dérivé **51a** a donc été effectuée en présence de cyclohexène. Ici, l'ajout de cyclohexène en excès devait permettre, une fois le groupe nitro (*a priori* plus réactif) totalement réduit, de stopper la réaction avant qu'il n'y ait réduction du bicycle aromatique. Malheureusement, le cyclohexène en large excès s'est révélé plus réactif que le composé nitré. Une fois le cyclohexène complètement réduit, nous avons noté une dégradation du dérivé nitré et aucune trace du dérivé diaminé désiré n'a été détectée par LC-MS.

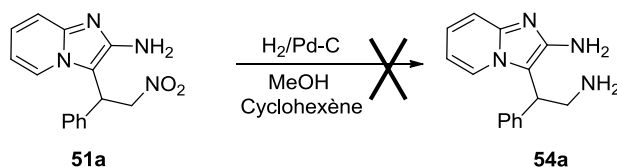


Schéma III- 58 : Réduction par hydrogénation pallado-catalysée en présence d'un alcène sacrificiel

Cette approche de réduction a donc été abandonnée au profit de la réduction par $\text{Ni}(\text{BH}_4)_2$. Le réactif est généré *in situ* par ajout progressif de borohydrure de sodium (NaBH_4) dans une solution méthanolique d'acétate de nickel II. Le composé nitré est complètement consommé en 30 minutes à 0°C (suivi réalisé par HPLC). La réaction est arrêtée par ajout de NH_4Cl et le produit est extrait au DCM. L'analyse LC-MS indique la formation majoritaire du composé d'intérêt, accompagné de produits secondaires qui n'ont pas pu être identifiés. Le brut réactionnel est réengagé dans la réaction suivante sans purification supplémentaire.

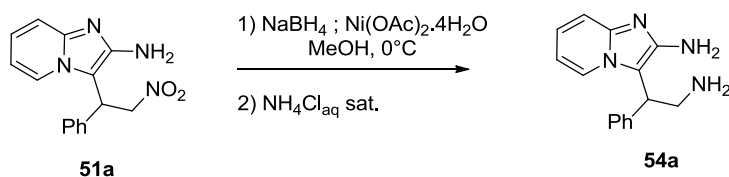


Schéma III- 59 : Réduction du composé **51a** avec le borohydrure de Nickel

IV.1.3. Étude de la cyclisation de la diamine **54a** en diazépine et détermination de l'activité enzymatique

La cyclisation/oxydation du composé diaminé en diazépine est réalisée selon une réaction "one pot." La diamine **54a** est mise en réaction avec un aldéhyde dans le *tert*-butanol à 70°C , pour former un aminal cyclique. Ce dernier est oxydé *in-situ* par de l'iode en présence de carbonate de potassium. Le 4-bromobenzaldéhyde et le 3,4-diméthoxybenzaldéhyde ont été choisis pour cette réaction de conversion du composé **54a** en diazépine. Le suivi est réalisé par HPLC. A la fin de la réaction, le milieu réactionnel est évaporé à sec. La solution est lavée avec du thiosulfate de sodium afin de réduire l'iode du milieu en ions iodures solubles dans la phase aqueuse. Après purification par chromatographie sur colonne d'alumine, les diazépines **55a** et **55b** sont isolées sous forme racémique avec un rendement de 15% et 24% respectivement.

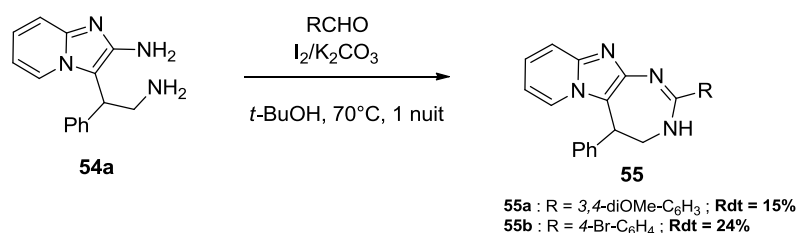


Schéma III- 60 : Synthèse des diazépines **55a** et **55b**

Ce faible rendement global, correspondant à 3 étapes de synthèse (réduction, cyclisation et oxydation) pourrait s'expliquer par une étape de réduction du produit nitré non

optimale. En effet, celle-ci conduit à la formation d'autres composés non identifiés, entraînant une chute de rendement en produit final.

Les composés **55a** et **55b** ont ensuite été évalués pour leur action inhibitrice à l'égard de la KLK7. La diazépine **55a** a montré un léger pouvoir inhibiteur avec une IC_{50} de 100 μ M. Le dérivé bromé **55b** est quant à lui dépourvu d'activité inhibitrice. Comme observé avec la série des diazépines-5-ones, la présence du substituant 3,4-diméthoxyphényle en position 2 du cycle diazépique est plus intéressante pour l'effet inhibiteur. Cependant, le déplacement du noyau aromatique en position 5 du cycle diazépine et la suppression de la fonction cétone par rapport au JMV5046 sont préjudiciables pour l'activité inhibitrice vis-à-vis de la KLK7. Toutefois, ce léger pouvoir inhibiteur du mélange racémique nous a encouragés à accéder à des composés optiquement actifs et espérer ainsi améliorer l'inhibition de l'enzyme cible avec un des énantiomères. Pour ce faire, il est nécessaire d'obtenir des produits d'addition de nitro-Michael dont le centre asymétrique est contrôlé. L'étude de la réaction de nitro-Michael en présence de catalyseurs chiraux a donc été envisagée.

IV.2. Étude de l'induction de chiralité lors de la réaction de nitro-Michael

La chiralité joue un rôle clé dans les phénomènes de reconnaissance moléculaire dans le monde du vivant. Parmi les différentes stratégies possibles pour accéder à des composés énantiomériquement purs, la catalyse asymétrique est la plus avantageuse, car elle permet, à partir d'une faible quantité de catalyseur chiral, de produire de grandes quantités d'un énantiomère pur. Un catalyseur chiral est une entité moléculaire chirale utilisée en synthèse asymétrique, et dont la chiralité est « propagée » au produit formé. C'est un réactif qui est capable de fixer un second réactif dit « prochiral » de manière stéréosélective et de créer ainsi, un nouveau centre asymétrique. En synthèse, on définit ce qu'on appelle l'excès énantiomérique (*ee*), ou rendement optique, qui représente le rapport des concentrations des deux énantiomères (*R*) et (*S*), selon la formule : $ee = ([R] - [S]) / ([R] + [S])$.

L'addition asymétrique de nitro-Michael a été déjà rapportée dans le cas de plusieurs hétérocycles riches en électrons, dont l'indole.

IV.2.1.Choix des catalyseurs

En 2005, R. P. Herrera et *al.* ont rapporté que des thiourées chirales permettaient d'induire l'addition énantiosélective de dérivés nitro-styrène sur l'indole.³⁰⁶

c1ccc2c(c1)c[nH]2 (59) + c1ccc(cc1)/C=C/[N+](=O)[O-] (60) $\xrightarrow[\text{Conditions}]{\text{Thiourée chirale (20 mol \%)}}$ c1ccc2c(c1)c[nH]2C(c3ccccc3)CC[N+](=O)[O-] (61)

Catalyseur	Solvant	T (°C)	Conversion (%)	ee (%)
<p>Cat. 1</p>	Toluène	20	40	7
<p>Cat.2</p>	Toluène	20	63	13
<p>Cat.3</p>	Toluène	20	>95	35
<p>Cat.3</p>	CH ₂ Cl ₂	-24	92	85

Schéma III- 61

Après une première évaluation de l'activité de plusieurs thiourées chirales sur l'induction de la réaction de nitro-Michael dans le toluène à température ambiante, seul le catalyseur **Cat. 3** permet d'obtenir une induction significative. Après optimisation des conditions de température et de solvant, l'utilisation de ce même catalyseur permet aux auteurs d'obtenir un bon excès énantiomérique (85%). Les auteurs ont montré que la présence du NH indolique est cruciale pour observer l'induction ; l'utilisation d'un dérivé *N*-Me indole conduisant à un très faible excès énantiomérique. Les auteurs ont alors proposé l'état de transition décrit dans la Figure III- 21. Les deux hydrogènes de la thiourée chirale peuvent activer le nitro-alcène *via* l'établissement de liaisons hydrogène. La fonction hydroxyle peut,

quant à elle, former une liaison hydrogène avec le NH indolique, favorisant alors l'attaque du nucléophile sur la face *Si* de la nitro-oléfine.

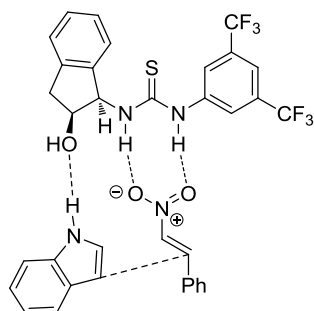


Figure III- 21 : Intermédiaire plausible permettant d'expliquer l'induction asymétrique obtenue avec la thiourée chirale **Cat. 3**

En 2008, J. Itoh et *al.* ont utilisé un catalyseur de type acide binaphtylphosphorique pour réaliser des additions énantiosélectives entre des dérivés de l'indole et des nitro-oléfines.³⁰⁷

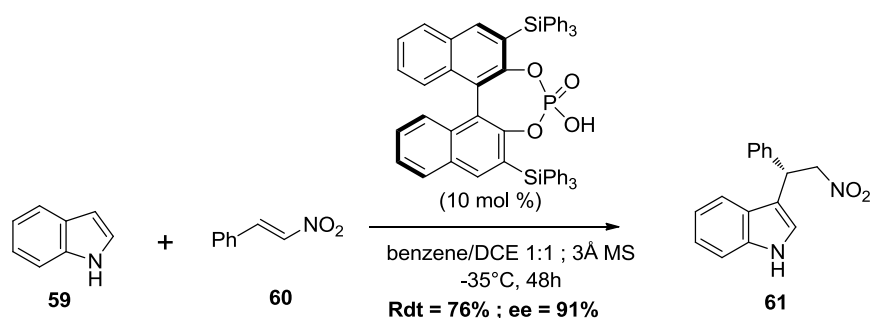


Schéma III- 62

Comme dans le cas des thiourées chirales, la présence du NH indolique est nécessaire pour obtenir à la fois un bon rendement et un fort excès énantiomérique. Ainsi, il a été proposé par les auteurs que le dérivé phosphorique pourrait activer la fonction nitro du réactif et un des oxygène du catalyseur pourrait établir une liaison hydrogène avec le NH indolique. L'induction de chiralité pourrait s'expliquer par l'état de transition représenté dans la Figure III- 22, où l'hydrogène vinylique du dérivé nitro-alcène se positionne derrière le cycle indole, conduisant majoritairement au dérivé **61** de configuration *S*.

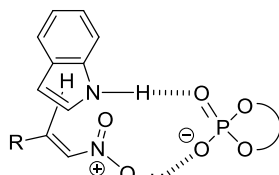


Figure III- 22 : État de transition plausible entre l'acide phosphorique chirale, l'indole et le nitro-styrène

En 2013, J.-R. Gao et *al.* ont rapporté que des complexes de nickel chiraux permettaient d'obtenir des dérivés d'addition de nitro-Michael avec de très bons rendements et une très bonne énantiosélectivité, à partir d'indole et de dérivé nitro-alcène β , β -disubstitué (Schéma III- 63). Parmi, les différentes *bis*-oxazolines étudiées, les ligands **L1** et **L2**, après complexation avec du nickel(II), permettent de catalyser efficacement la réaction et conduisent à des excès énantiomériques de 90% et 97% respectivement.

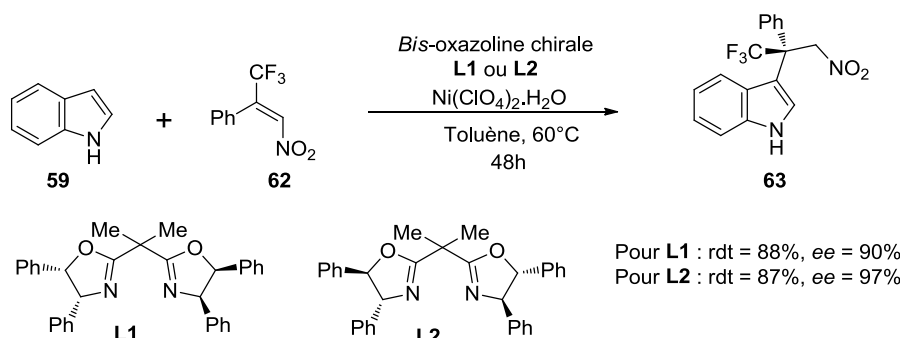


Schéma III- 63

Un modèle d'interaction a été proposé par les auteurs afin d'expliquer l'induction asymétrique observée avec ces catalyseurs. Le dérivé nitro-alcène peut se coordonner à l'ion nickel II et conduit à la dépolarisation de la liaison alcène. L'environnement chiral généré par le ligand oxazoline conduit à une attaque préférentielle de l'indole par la face *Re*.

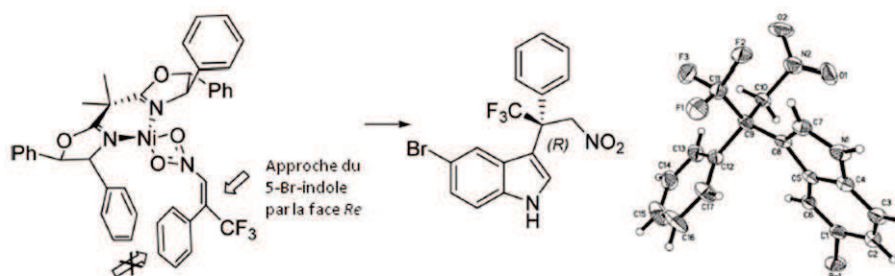


Schéma III- 64 : Modèle proposé pour expliquer l'induction asymétrique obtenue avec le 5-bromo-indole, et le catalyseur chiral généré *in situ* entre le ligand **L2** et le sel de Nickel(II). A droite, structure cristallographique du produit de la réaction, mettant en évidence une configuration *R*.

Dans le cadre de notre étude sur l'addition énantiosélective du *trans*- β -nitrostyrène sur la 2-amino-IP, nous avons choisi d'étudier plusieurs familles de catalyseurs. Ainsi sur la base des résultats rapportés dans la littérature concernant l'addition de nitro-Michael sur des dérivés indoliques, trois thiourées chirales (**Cat.1**, **Cat.2** et **Cat.3**), un acide binaphtylphosphorique (**Cat. 4**) et un complexe *bis*-oxazoline-nickel II (**Cat.5**) ont été

sélectionnés pour notre étude. De plus, les alcaloïdes extraits du *Cinchona spp.* (Cat. 6 à 9) ont été également choisis, car ceux-ci sont commercialement disponibles et ont déjà démontré leur efficacité dans diverses réactions asymétriques, même si elles n'ont pas encore été décrites dans la réaction de nitro-Michael.

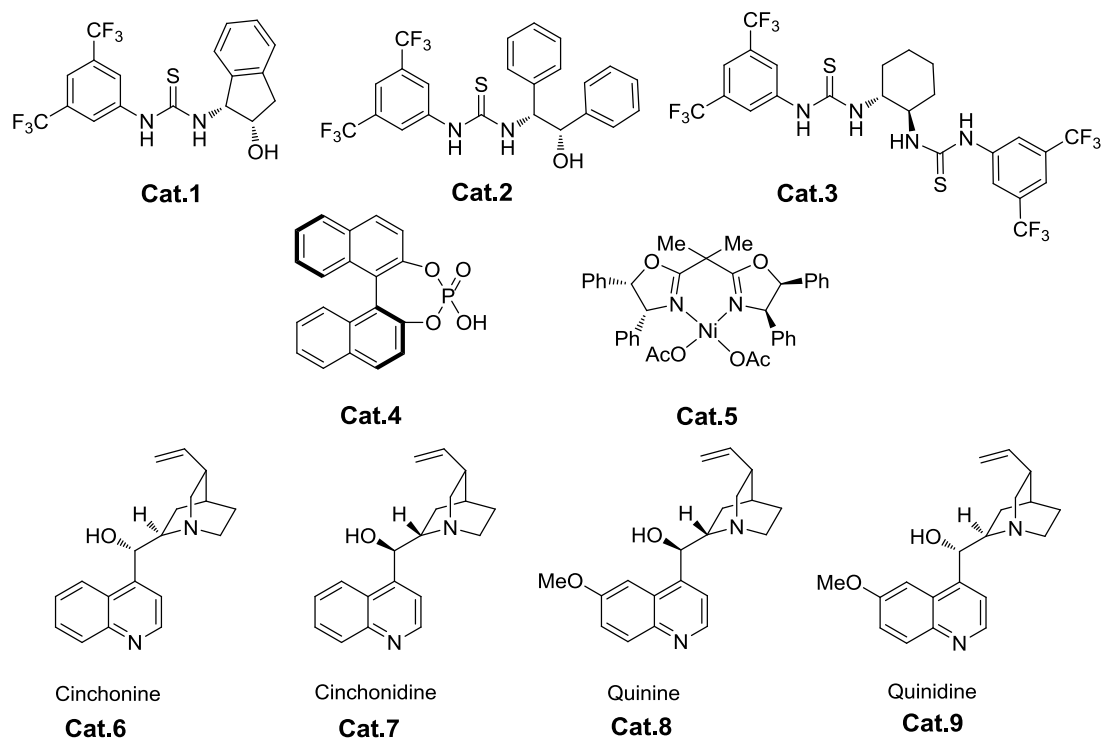


Figure III- 23 : Catalyseurs sélectionnés pour l'étude

L'acide *S*-binaphtylphosphorique ou (*S*)-(+)-1,1'-binaphthyl-2,2'-diyl hydrogéno-phosphate (Cat. 4) ainsi que les alcaloïdes extraits du *Cinchona spp.* (Cat. 6 à 9) sont commercialement disponibles. Les autres catalyseurs ont été synthétisés, selon les protocoles décrits dans la littérature.

IV.2.2. Synthèse des catalyseurs

Les thiourées chirales (Cat. 1 à 3) ont été synthétisées selon la méthode décrite par R. P. Herrera et *al.* en 2005.³⁰⁶ Les catalyseurs sont obtenus par réaction de condensation entre un équivalent d'isocyanate de 3,5-bis(trifluorométhyl)phényle **68** et un dérivé amino-alcool (le (*1S*, *2R*)-1-amino-indan-2-ol **69** pour le catalyseur **Cat.1**, et le (*1S*, *2R*)-2-amino-1,2-diphényléthanol **70** dans le cas du catalyseur **Cat.2**). La *trans*-cyclohexane-1,2-diamine **71** a

été condensée avec deux équivalents de l'isocyanate dans le dichlorométhane afin d'obtenir le catalyseur **Cat.3**. A la fin de la réaction, le dichlorométhane est évaporé et les thiourées sont isolées sous forme de solide blanc cristallin avec des rendements quantitatifs.

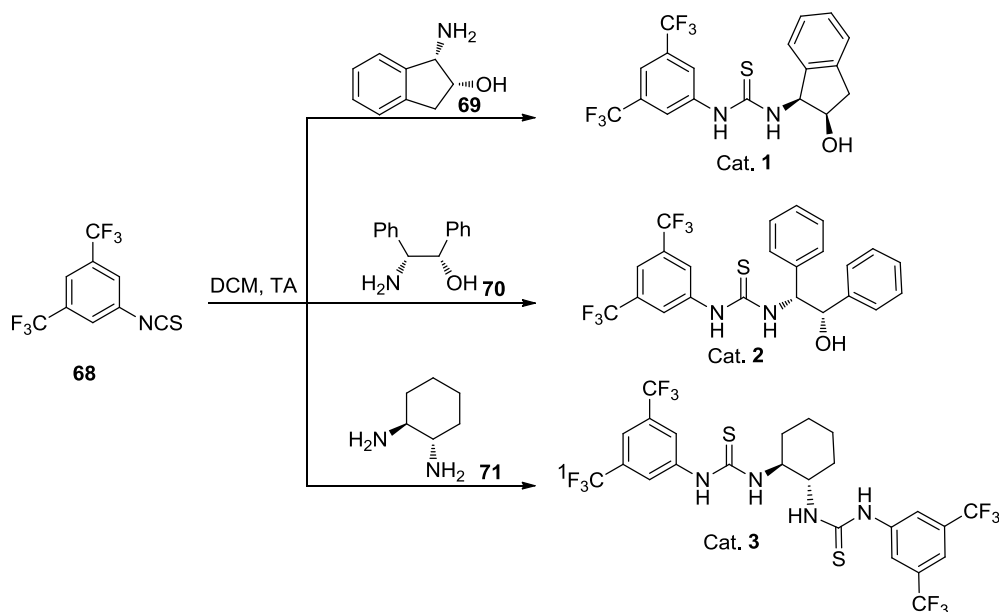


Schéma III- 65 : Synthèse des catalyseurs **Cat. 1, 2 et 3**

Le catalyseur **Cat. 5** est un complexe *bis*-oxazoline-nickel II. Il est nécessaire de synthétiser au préalable le dérivé *bis*-oxazoline disubstitué, qui sera complexé par la suite au sel de Nickel.

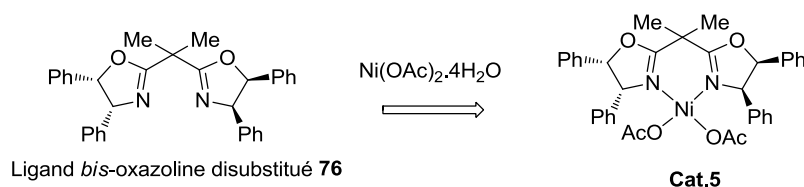


Schéma III- 66 : Formation du complexe *bis*-oxazoline-nickel II (Cat. 5**)**

La synthèse du dérivé *bis*(oxazoline) **76** a été réalisée à partir du composé (1*S*, 2*R*)-2-amino-1,2-diphényléthanol **72**. La première étape consiste à former le dérivé *bis*-amide intermédiaire **74** en faisant réagir le dichlorure de 2,2-diméthylmalonyle sur l'aminoolcool **72** en présence d'une base, la triéthylamine, dans le dichlorométhane. Le dérivé *bis*-amide **74** est isolé sous forme d'un solide blanc cristallin après recristallisation dans l'acétate d'éthyle, avec un rendement de 88%. Le dérivé *bis*-amide est ensuite cyclisé selon la méthode décrite par A. J. Simpson et *al.* en 2013.³⁰⁸ La réaction se fait à reflux du xylène en présence d'une quantité catalytique de molybdate d'ammonium tétrahydraté, à l'aide d'un appareil de Dean-Stark. A

la fin de la réaction, le solvant est éliminé et le dérivé **76** est isolé sous forme d'un solide blanc cristallin, après une récrystallisation dans le *n*-heptane, avec un rendement de 30%.

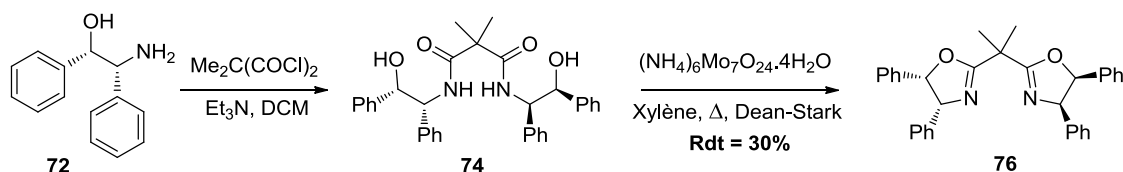


Schéma III- 67 : Synthèse du Ligand *bis*(oxazoline) **76** selon l'approche de Simpson et *al.*

Une fois les catalyseurs obtenus, la réaction de nitro-Michael a alors été étudiée avec la 2-amino-IP et le *trans*-nitrostyrène comme réactifs.

IV.2.3. Étude de l'addition de nitro-Michael

La réaction d'addition de nitro-Michael a été étudiée à 0°C dans le dichlorométhane, en utilisant 10 mol% de catalyseur par rapport au dérivé trifluoroacétamide **3**, précurseur stable de la 2-amino-IP **4**. L'influence de l'abaissement de la température (-40°C) a également été étudiée dans le cas des catalyseurs **Cat.1**, **4** et **5**. Dans l'ensemble des conditions testées, la réaction est totale entre 15 minutes et 1 heure d'agitation à froid.

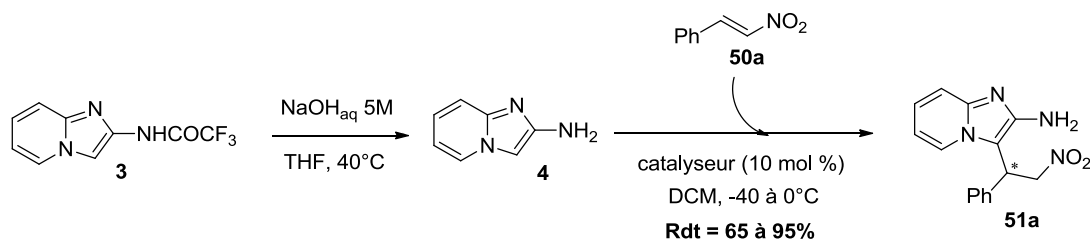


Schéma III- 68 : Synthèse énantiosélective du produit d'addition de nitro-Michael **51a**

Après une purification sur colonne de silice, les produits de mono-alkylation ont été isolés avec des rendements de 65 à 95%. Ces composés ont alors été analysés par HPLC chirale pour déterminer l'excès énantiomérique (*ee*). A ce titre, une phase normale de type *AD-H Daicel Chiralpak ID 0.46 x 0.25 cm* a été utilisée. L'élution de cette phase par un mélange de *n*-hexane et d'isopropanol 70/30 v/v, à un débit de 0.8 mL.min⁻¹, a permis de séparer analytiquement les deux énantiomères du mélange racémique, issu de la réaction menée sans catalyseur (Figure III- 24).

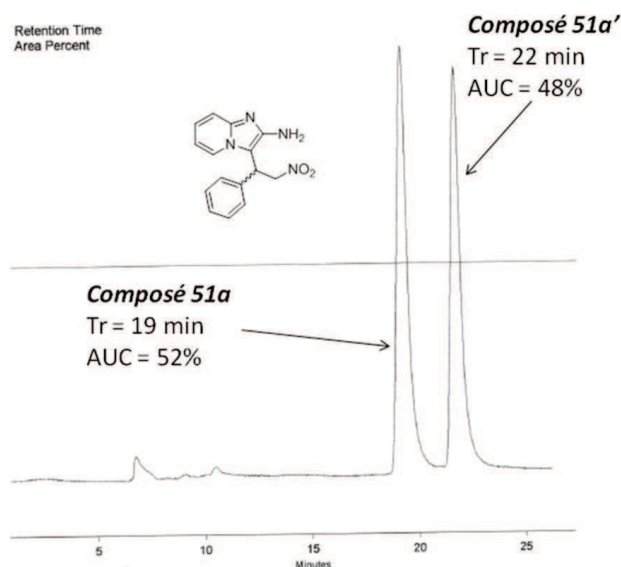


Figure III- 24 : Séparation analytique des énantiomères du mélange racémique

Quelque soit le catalyseur et la température réactionnelle étudiés, aucun excès énantiomérique notable n'a pu être mis en évidence. Les résultats de cette étude en termes d'excès énantiomériques pour chacun des catalyseurs sont rapportés dans le Tableau III- 20.

Catalyseurs testés	Excès énantiomérique <i>ee</i> (%)	
	Réaction à 0°C	Réaction à -40°C
Cat. 1	1	6
Cat. 2	4	-
Cat. 3	8	-
Cat. 4	2	4
Cat. 5	7	5
Cat. 6	7	-
Cat. 7	4	-
Cat. 8	4	-
Cat. 9	1	-

Tableau III- 20 : Excès énantiomériques obtenus dans différentes conditions

Alors que la 2-amino-IP possède dans sa structure une fonction amine primaire et un azote *N*-1 capables d'établir potentiellement des liaisons hydrogène avec les catalyseurs testés, il semble que la trop grande vitesse de la réaction soit rédhibitoire pour obtenir un contrôle de la chiralité lors de l'addition de nitro-Michael. Même lorsque la réaction est menée à -40°C au lieu de 0°C, aucune augmentation significative de l'excès énantiomérique n'est observée.

➤ Conclusion

Une étude de la réactivité de la 2-amino-IP dans le cadre de la réaction de nitro-Michael a été effectuée et nous avons pu démontrer que ce composé pouvait être facilement C-3 alkylé dans ces conditions. Ceci nous a conduit à synthétiser une librairie de composés 3-(2-nitro-1-(aryl)éthyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-2-amines avec de bons rendements. La synthèse d'une famille originale de dérivés IP-diazépiniques a été initiée à partir de ces produits d'addition de nitro-Michael. Deux dérivés ont ainsi pu être obtenus sous forme racémique et ont été évalués pour leurs activités inhibitrices potentielles à l'égard de la KLK7. Les deux molécules testées n'ont cependant pas montré d'inhibition significative de la protéase cible. Du point de vue chimique, l'optimisation des conditions de réduction du groupement nitro devra être effectuée, afin d'accéder aux diazépines correspondantes avec des rendements plus acceptables.

De plus, en vue de l'obtention de composés IP-diazépiniques énantio purs dans cette série, une étude du contrôle du centre asymétrique créé lors de l'addition de nitro-Michael a été entreprise. Les premiers essais n'ont pas permis d'obtenir une énantiosélectivité significative. La grande réactivité de la 2-amino-IP pourrait expliquer les faibles résultats d'induction obtenus, l'addition de Michael se faisant très rapidement sans catalyseur et même à faible température. Il serait utile de poursuivre les études d'induction de chiralité pour essayer d'obtenir une énantiosélectivité effective. En particulier, la réaction du dérivé IP trifluoroacétamide **3**, qui possède une position C-3 beaucoup moins enrichie que la 2-amino-IP, pourrait être étudiée en présence de catalyseurs, dans le cadre de la réaction de nitro-Michael.

Dans le chapitre suivant, nous allons décrire les travaux amorcés pour accéder à des composés diazépiniques en série indole. Afin d'étudier l'importance du motif IP du composé JMV5046 pour l'inhibition de la KLK7, nous avons entrepris de modifier ce motif par un noyau indole. Ceci devrait permettre de remplacer l'azote *NI*, accepteur de liaison hydrogène dans le cas de l'IP, par un *NH* donneur de liaison hydrogène dans le cas de l'indole (Figure III- 25).

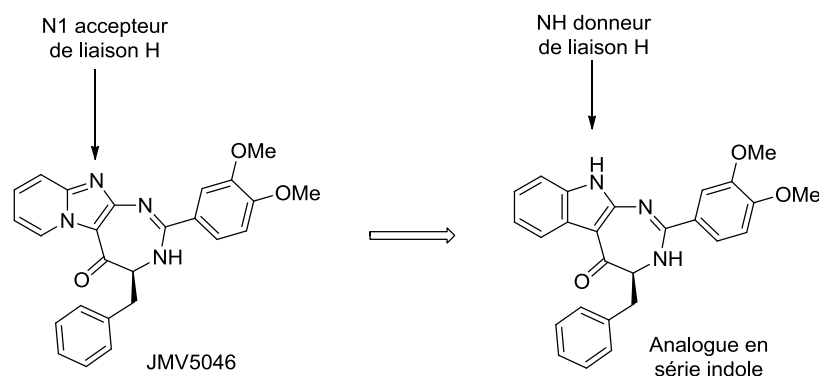


Figure III- 25

V. ÉTUDE POUR LA SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS INDOLODIAZÉPINONES

L'indole représente une structure hétérocyclique importante, présente dans de très nombreuses molécules bioactives. De nombreuses substances endogènes actives telles que le tryptophane, la sérotonine, la mélatonine, et beaucoup de médicaments cliniquement utilisés tels que l'anti-inflammatoire non-stéroïdien indométhacine, l'antiémétique ondansétron et l'antimigraineux sumatriptan possèdent un motif indole dans leur structure.³⁰⁹

Sur le plan chimique, le motif indole est une structure riche en électrons et enclin à subir des réactions d'oxydation et de substitutions électrophiles aromatiques. Dans le cadre de nos travaux sur le développement de molécules hétérocycliques, la fusion d'un cycle diazépique à ce système hétérocyclique a été étudiée, afin d'accéder à des composés indolodiazépines. Ces composés pourront ensuite être évalués pour leur potentialité inhibitrice à l'égard de la KLK7. La chimie des indolo[1,4]diazépines a été décrite dans la littérature avec des applications thérapeutiques. Par exemple, S. A. Lakatos et *al.* ont décrit en 2005, la synthèse de dérivés [1,4]diazépines fusionnés avec des cycles indoline et maléimide.³¹⁰ En 2008, V. N. Danilenko et *al.* ont décrit la synthèse de dérivés [1,4]diazépines du même genre, comme inhibiteurs de protéines kinases humaines et bactériennes.³¹¹

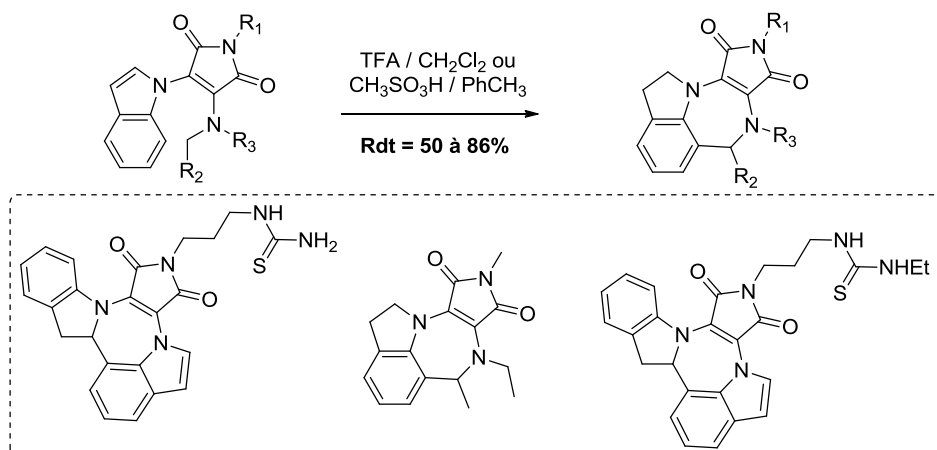


Figure III- 26 : Synthèse de dérivés indolo[1,4]diazépines et exemples de composés

E 2011, Y. Zhou et *al.* ont également mis au point une approche "domino" permettant d'obtenir des dérivés indolo[1,4]diazépinones, fusionnés avec des cycles de type benzénique et pyrrolique/pyridinique.³¹²

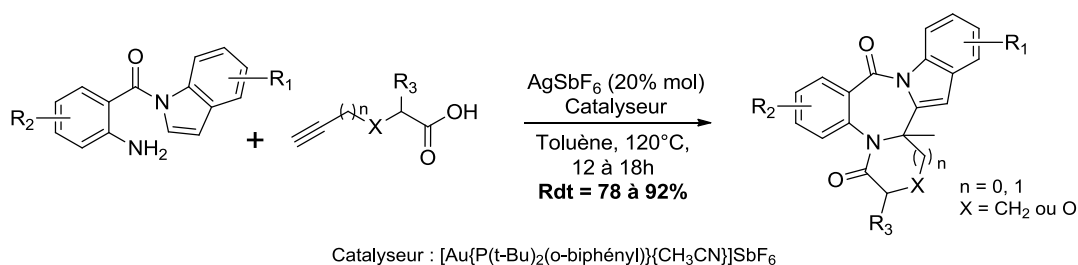


Schéma III- 69

A notre connaissance, les indolo[1,3]diazépines n'ont pas été rapportées dans la littérature à ce jour.

Nous avons décrit précédemment l'obtention des dérivés IP-[1,3]diazépiniques, à partir du synthon 2-amino-IP, *via* une acylation ou une alkylation sélective sur le carbone 3 de l'hétérocycle. Nous avons alors souhaité étudier la réactivité du 2-amino-indole vis-à-vis de la réaction d'acylation avec des acides aminés protégés. Une C-acylation de ce motif, comme observée avec la 2-amino-IP, permettrait d'accéder à des indolo-1,3-diazépines (Schéma III- 70, voie A). Dans le cas d'une N-acylation, l'intermédiaire obtenu pourrait être utilisé pour accéder, *via* une réaction de Pictet-Spengler, à des dérivés indolo-1,4-diazépiniques (Schéma III- 70, Voie B).

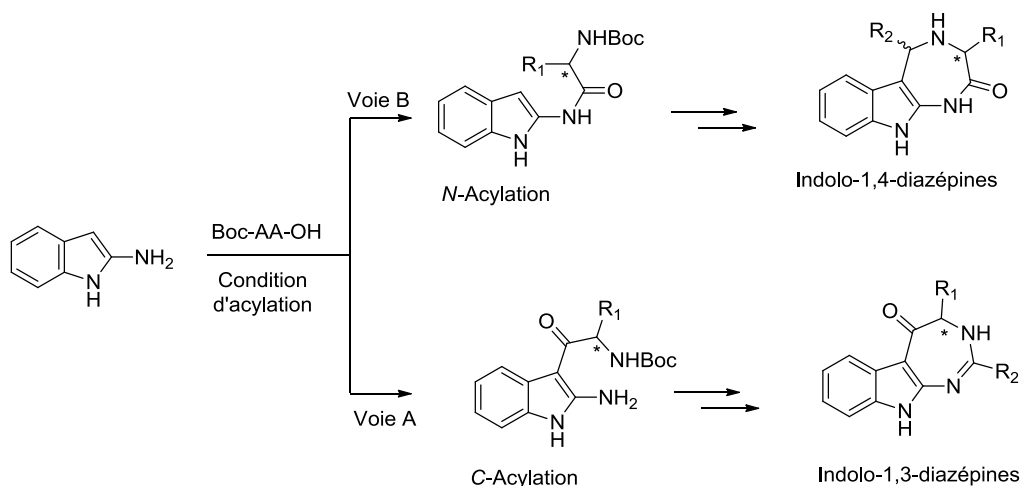


Schéma III- 70 : Possibilités d'acylation du 2-amino-indole et synthèse des diazépines fusionnées

Le dérivé 2-amino-indole n'étant pas disponible commercialement, il a tout d'abord été synthétisé.

V.1. Étude de la synthèse du 2-amino-indole

Vers la fin des années 1950, H. R. Snyder et *al.* ont montré que le traitement de dérivés 2-(2-nitrophényle)acétonitrile substitués **77** par le réactif de Stephen (solution étherée de chlorure d'étain anhydre, saturée avec le chlorure d'hydrogène gazeux), conduisait aux composés 2-amino-indoles **78** correspondants au lieu de donner les composés indoles **79** attendus.³¹³

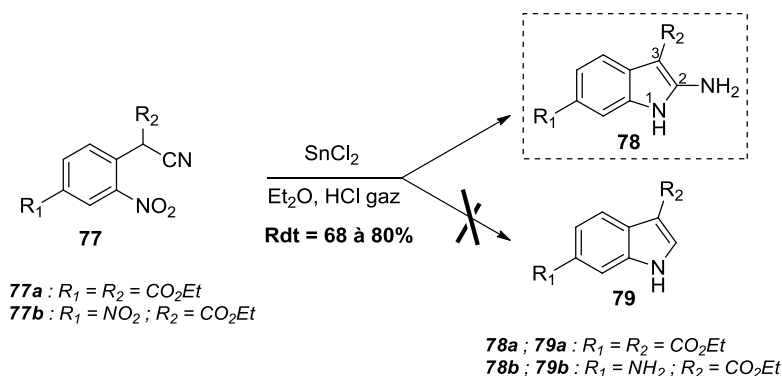


Schéma III- 71 : Synthèse de dérivés indoles par réduction catalytique de cyanure d'*ortho*-nitrobenzyles

Les acétates de 2-cyano-2-(2-nitrophényle) ont été largement utilisés comme intermédiaires clés de synthèse des dérivés indoles. Les dérivés indoles ainsi formés diffèrent suivant les conditions réactionnelles utilisées. Par exemple, l'hydrogénation catalytique du

composé **80** (Schéma III- 72) avec du palladium adsorbé sur charbon dans l'acétate d'éthyle conduit généralement aux dérivés indole-3-carboxylates **81**.^{314, 315} Toutefois, si le groupe R est un benzyle, on obtient des dérivés indoles non substitués en 2 et 3 (composé **82**).³¹⁶ La réduction du composé **80** avec de la poudre de zinc dans l'acide acétique à une température de 80 à 100°C génère les dérivés 2-amino-indole-3-carboxylates **83**. Lorsque cette réduction est réalisée à une température beaucoup plus basse ou lorsque l'agent de réduction est le chlorure d'étain, les produits majoritaires sont des dérivés *N*-hydroxy-2-aminoindoles **84**.³¹⁷

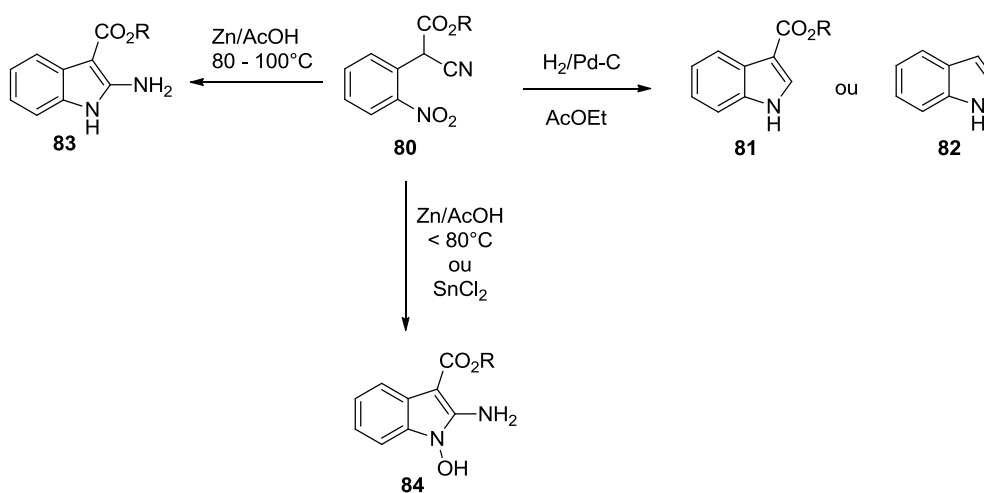


Schéma III- 72

La synthèse du dérivé 2-amino-indole non substitué a également été décrite dans la littérature par plusieurs auteurs. Dans la plupart des protocoles utilisés, le 2-(2-nitrophényl)-acétonitrile **85** est utilisé comme réactif de départ. La première étape correspond à une réduction du groupe nitro pour former le dérivé aminé **86** correspondant, lequel conduit à l'amidine **87** *via* une cyclisation intramoléculaire. L'amidine **87** est ensuite capable de s'isomériser pour former le 2-amino-indole **88** ; cette isomérisation est facilitée par la présence d'au moins un proton acide en position 3. Cependant, des études de la basicité et l'analyse des spectres UV et IR du 2-aminoindole laissent penser que ce composé existe préférentiellement sous la forme **87**.³¹⁸

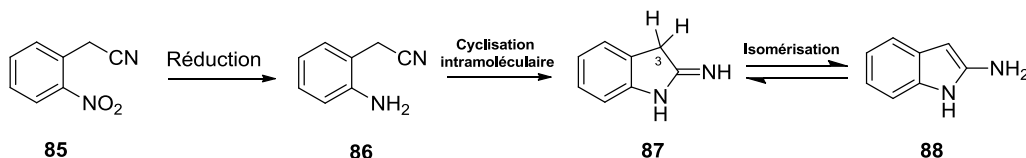


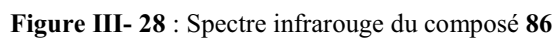
Schéma III- 73 : Mécanisme vraisemblable pour la formation du 2-aminoindole

Afin d'accéder au dérivé 2-amino-indole, plusieurs conditions opératoires ont été évaluées (Tableau III- 21).

Entrée	Agent réducteur	Conditions
1	SnCl ₂	EtOH, 30°C, HCl 37%, 1h30
2	SnCl ₂	Et ₂ O, TA, HCl gaz, 1h
3	Zn poudre	THF, 40°C puis AcOH, Δ, HCl gaz
4	Fe poudre	AcOH, Δ, 35 min
5	H ₂ , Pd/C	HCl 37%, EtOH, TA, 1 nuit puis Δ, 3h

Tableau III- 21

Les premières conditions étudiées sont celles rapportées par T. Matsumoto *et al.* (entrée 1).³¹⁹ Ces auteurs obtiennent le 2-amino-indole avec un rendement de 52%, après réduction du 2-(2-nitrophényl)acétonitrile **85** par le chlorure d'étain dans l'éthanol, en présence d'acide chlorhydrique à 37%. Dans ces conditions opératoires, le composé **85** est rapidement consommé (~1h30) et s'accompagne de la formation de 2 composés de temps de rétention très proches lors de l'analyse HPLC. Un allongement du temps de réaction conduit à l'apparition de plusieurs produits secondaires. La réaction est alors arrêtée et traitée. La solution est concentrée puis refroidie à 0°C, afin de précipiter les sels d'étain qui sont éliminés par filtration. Le filtrat est ensuite basifié par ajout d'une solution aqueuse de soude à 30% jusqu'à pH 9-10, afin de précipiter le produit sous forme base. Une faible quantité de précipité est récupérée par filtration et analysée. L'analyse LC-MS montre la présence de deux composés possédant la même masse molaire ($[M+H]^+ = 133$). Un des deux composés a pu être isolé par chromatographie sur colonne d'alumine (composé **86**). L'analyse de ce composé par spectroscopie RMN et infrarouge indique clairement que le composé **86** correspond au dérivé réduit mais non cyclisé. En effet, le spectre RMN du proton indique l'absence d'un signal qui pourrait correspondre à un proton porté par l'azote endocyclique de l'indole. De plus, on observe deux singulets, intégrant chacun pour 2 protons, à 3,76 ppm et 5,14 ppm pouvant correspondre respectivement aux protons du méthylène et de l'amine de l'intermédiaire **86** (Figure III- 27). Par ailleurs, le spectre infrarouge de ce composé met en évidence la présence d'une bande de vibration à 2260 cm⁻¹ pouvant correspondre à la fonction nitrile (Figure III- 28).



Nous nous sommes alors orientés vers les conditions décrites par Stephen et *al.* (Entrée 2).³²⁰ Dans ce cas, la réduction et la cyclisation sont réalisées en milieu organique (éther diéthylique). L'amine finale est isolée par les auteurs, par précipitation, après saturation du milieu avec de l'HCl gazeux. Ce protocole possède l'avantage d'éviter la présence d'eau et devrait donc éviter une perte du composé aminé par solubilisation dans le milieu.

Le 2-(2-nitrophényl)acétonitrile **85** est réduit par ajout successif de chlorure d'étain dans l'éther diéthylique, à température ambiante. Dans ces conditions, le produit de départ **85** est rapidement consommé (~30 min). L'analyse LC-MS indique la présence de deux composés de masse identique ($[M+H]^+ = 133$), pouvant correspondre aux dérivés **86** et **87/88**. Comme précédemment, même après un temps de réaction prolongé, la réaction n'évolue pas. La précipitation par HCl gaz n'a pas permis d'isoler le produit désiré. Une extraction avec de l'acétate d'éthyle après basification avec une solution d'ammoniaque à 28% permet d'isoler un résidu qui se dégrade très rapidement à l'air. En effet, J. Kebrle et *al.* ont rapporté en 1956, que le 2-amino-indole sous forme base, est relativement instable en présence d'oxygène.³²¹ Ceci pourrait expliquer les résultats que nous avons observés.

D'autres conditions réactionnelles ont été alors testées, afin d'obtenir uniquement le dérivé cyclisé **87** ou **88** sous forme de sel (Tableau III- 21). L'utilisation de la poudre de zinc dans l'acide acétique à reflux permet de former le composé attendu. Cependant, la saturation par le chlorure d'hydrogène n'a pas permis d'isoler le produit (entrée 3). Lorsque le fer est utilisé comme agent de réduction dans l'acide acétique (entrée 4), seul un produit est formé. Toutefois, il est accompagné de sels de fer difficilement séparables.

Finalement, une réduction par hydrogénation catalytique avec du palladium sur charbon, suivie d'une cyclisation à reflux de l'éthanol, en présence de quelques gouttes d'acide chlorhydrique à 37%, a permis d'obtenir le dérivé cyclisé **89** sous forme de chlorhydrate, avec un rendement de 85% (entrée 5 et Schéma III- 74).

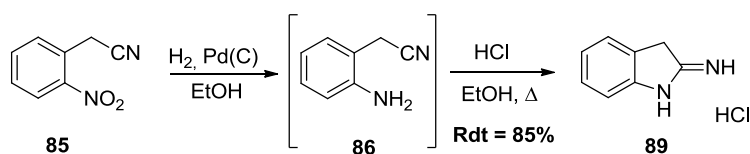


Schéma III- 74 : Synthèse du dérivé **89**

L'analyse du spectre RMN ^1H du composé montre la présence d'un singulet élargi à 10,6 ppm correspondant au NH indolique, indiquant que le produit est bien cyclisé. On note également l'existence de 4 protons aromatiques, ainsi que la présence d'un singulet à 4.77 ppm intégrant pour 2 protons. De plus, le spectre RMN ^{13}C montre un signal à 35.9 ppm indiquant que le produit isolé correspond au dérivé cyclisé sous forme indolimine **89** et non aromatique.

Ce protocole a l'avantage d'éviter la présence de sels métalliques à la fin de la réaction, ce qui permet d'obtenir le composé **89** suffisamment pur pour être utilisé directement dans la réaction suivante. Compte tenu de son instabilité, ce produit est conservé sous sa forme chlorhydrate.

Le synthon 2-amino-indole une fois obtenu, sa réactivité a été étudiée dans le cadre de la réaction d'acylation, avec un acide aminé protégé.

V.2. Étude de l'acylation du dérivé 2-amino-indole

Le 2-amino-indole a été engagé dans une réaction de couplage avec un acide aminé dont la fonction amine est protégée par un groupement "Boc". Le but est de déterminer précisément, si l'acylation a lieu sur l'amine exocyclique (Voie **A**) ou en position 3 du cycle (Voie **B**), dans la mesure où deux positions peuvent potentiellement être acylées sur ce synthon (Schéma III- 75). Il est à noter que dans le cas de la 2-amino-IP, seule une C-3 acylation a été obtenue.

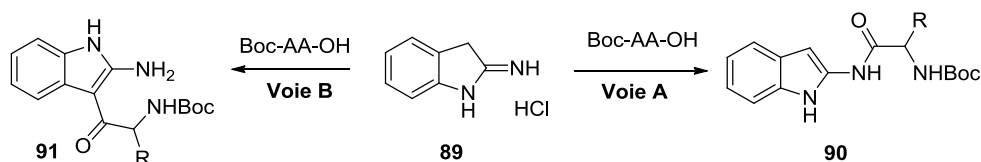


Schéma III- 75. N-acylation versus C-acylation

La phénylalanine a été choisie pour les premiers essais. Les agents de couplage et les conditions réactionnelles sont identiques à ceux utilisés lors de la réaction d'acylation de la 2-amino-IP (*ie* EDCI, HOBt, triéthylamine dans le dichlorométhane). L'avancement de la réaction est suivi par CCM et HPLC. La réaction est complète au bout de deux heures d'agitation. Il est à signaler que deux équivalents de base (triéthylamine) sont requis pour cette réaction. L'analyse LC-MS du milieu réactionnel révèle la présence d'un composé de masse molaire 379, correspondant à la masse du produit désiré **90a**. Le composé est isolé après

purification sur une colonne chromatographique de gel de silice (éluant : DCM/EtOH 99:1 v/v), avec un rendement de 48%.

Pour déterminer la position d'acylation, des expériences de spectroscopie RMN ont été réalisées. Le spectre RMN du proton (Figure III- 29) montre la présence d'un singulet à 5,85 ppm correspondant au proton porté par le carbone en position 3 et d'un singulet élargi à 10,2 ppm correspondant au NH endocyclique du noyau indole. Ces deux éléments indiquent que l'acylation a eu lieu sur l'amine exocyclique et non sur le sommet 3 de l'hétérocycle ou sur le NH endocyclique de l'indole (Schéma III- 75, composé **90**).

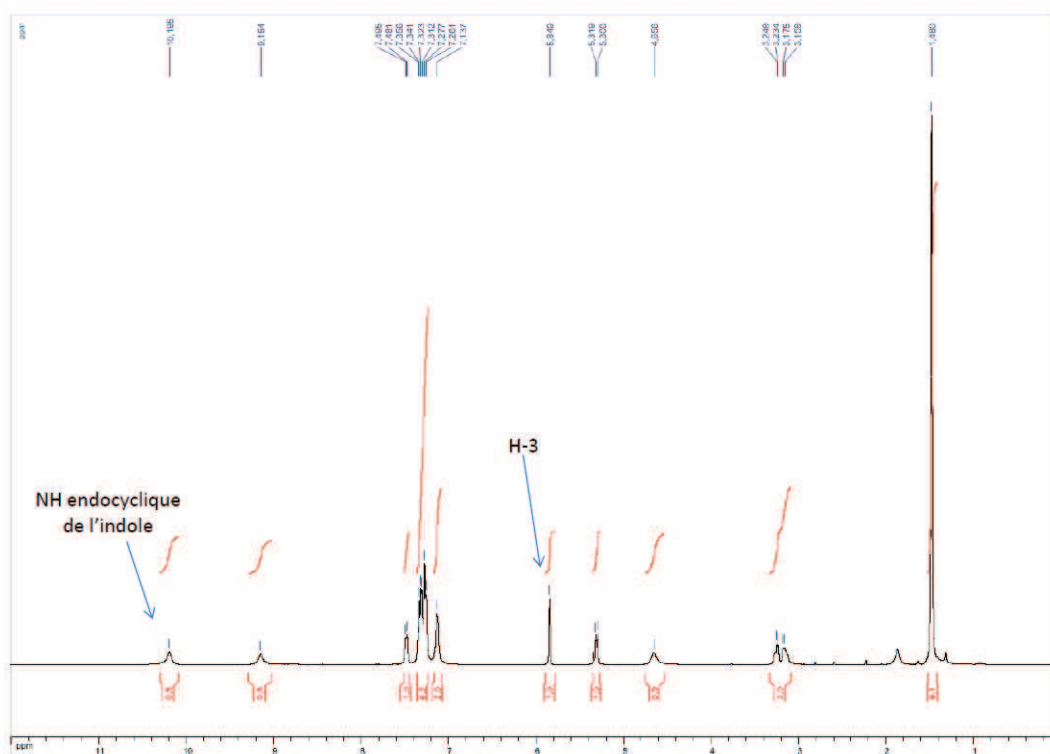


Figure III- 29 : Spectre RMN ^1H correspondant au composé **90a** ($R = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$)
Le signal correspondant aux protons H3 et du NH indolique sont indiqués par une flèche.

Ainsi, la réactivité du 2-amino-indole n'est pas comparable à celle de la 2-amino-IP où seule la C-acylation est observée dans les mêmes conditions réactionnelles. Ceci pourrait être expliqué par un caractère *pseudo*-aromatique du C-3 de l' amino-indole. En effet, le spectre RMN ^1H du composé **88** présente un H-3 à 5,85 ppm, déplacement de proton éthylénique, plutôt que de proton aromatique. Dans ces conditions, la substitution électrophile aromatique semble défavorisée, l'amine exocyclique étant alors plus réactive que le C-3 du cycle.

De même, l'utilisation de Boc-Ala-OH comme acide aminé permet d'obtenir le dérivé *N*-acylé **90b** correspondant, avec un rendement de 48% après purification chromatographique.

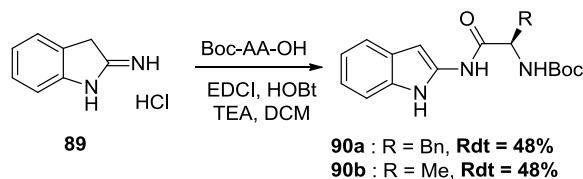


Schéma III- 76 : *N*-acylation du 2-amino-indole

Le dérivé *N*-acylé **90a** a ensuite été engagé dans une réaction de cyclisation selon la méthode de Pictet-Spengler.

V.3. Étude de la cyclisation de Pictet-Spengler

La réaction de Pictet-Spengler est une réaction de cyclocondensation intermoléculaire entre un composé aromatique de type β -aryléthylamine, et un composé carbonylé (aldéhyde, cétone). Elle a été décrite en 1911, pour la première fois et représente l'une des stratégies les plus importantes pour la synthèse d'alcaloïdes dérivés d'isoquinoléines et d'indoles. Cette réaction consiste à réaliser dans un premier temps la condensation de l'amine et du dérivé carbonylé pour former l'imine correspondante. Celle-ci peut alors être attaquée par le noyau aromatique π -excédentaire, et conduire à la cyclisation du composé. Cette réaction, qui nécessite généralement un chauffage du milieu réactionnel et l'utilisation d'un catalyseur acide, a été étendue à de nombreuses amines liées à des systèmes aromatiques ou hétéroaromatiques riches en électrons (pyrrole, thiophène, indole, etc.). Plusieurs systèmes arylidiazépines ou arylazépines ont été ainsi développés grâce à cette méthode. Par exemple, P. Deaudelin et *al.* ont décrit en 2008, l'accès à des composés pyrrolo[1,4]diazépin-2-ones *via* une approche de Pictet-Spengler diastéréosélective, à partir de chlorhydrates d'amines et en présence d'acide trifluoroacétique.³²² Dans ces conditions, seul le dérivé de configuration *trans* est obtenu.

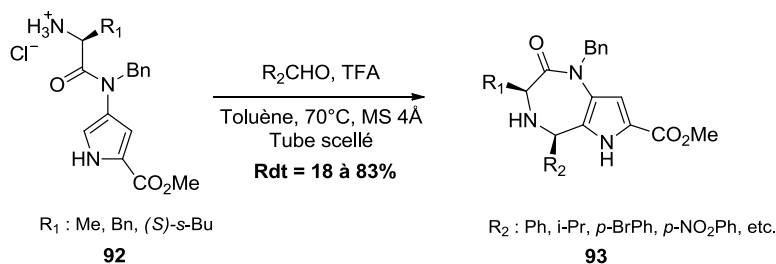


Schéma III- 77 : Synthèse de dérivés pyrrolo[1,4]diazépiniques

K. S. Sudhir et *al.* ont utilisé en 2009, un protocole visant à effectuer la réaction de Pictet-Spengler dans le dichlorométhane à TA, en présence de 2% d'acide trifluoroacétique. Ce protocole leur a permis d'accéder à des dérivés benzazépino-indoles **95** dans des conditions relativement douces.³²³

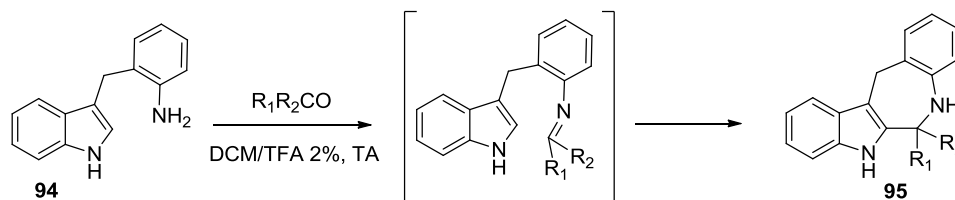


Schéma III- 78 : Synthèse de dérivés benzazépino-indoles

Au sein de notre équipe, l'accès à des dérivés thiéno[1,4]diazépiniques a été très récemment décrit en série thiophène selon la même approche, mais à partir d'amines libres et sans catalyse acide. Dans ces conditions, un mélange de deux diastéréoisomères est formé dans un rapport d'environ 50/50.³²⁴

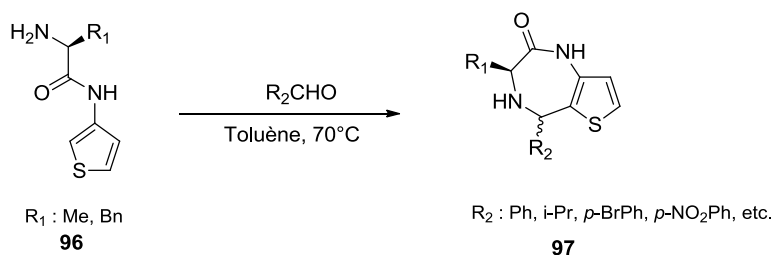


Schéma III- 79 : Synthèse de dérivés thiéno[1,4]diazépiniques

Des variantes de la réaction de Pictet-Spengler où l'intermédiaire imine est activé sous forme d'un dérivé *N*-acyliminium ont été également rapportées. Ainsi, D. Bonnet et A. Ganesan ont décrit une réaction de Pictet-Spengler impliquant un carbamate activé (dérivé **105**), pour accéder à des composés tétrahydro-β-carbolinehydantoïnes **107**.³²⁵

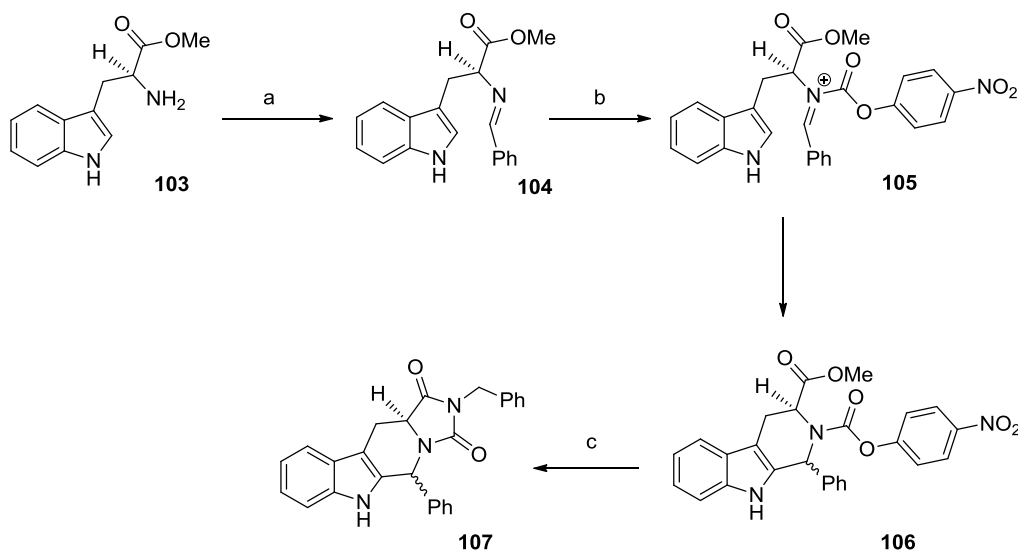


Schéma III- 80 : Condensation de Pictet-Spengler *via* un intermédiaire *N*-acyliminium

Réactifs et conditions : (a) PhCHO, TFA 1%, DCM, TA, 3h ; (b) *p*-NO₂-C₆H₄-OCOCl, pyridine, DMAP, DCM, TA, 15h; (c) PhCH₂NH₂, Et₃N, DMF, 90°C, 16h.

La condensation de Pictet-Spengler à partir du dérivé 2-*N*-acyle-indole protégé sous forme de carbamate a d'abord été étudiée.

V.3.1. Étude de la cyclisation à partir du dérivé protégé

La réactivité du dérivé non déprotégé (composé **90a**) a été étudiée sans catalyse acide. Le dérivé **90a** est engagé avec le *para*-bromobenzaldéhyde dans le dichlorométhane à 0°C dans des conditions anhydres (flux d'argon). L'avancement de la réaction est suivi par CCM et HPLC. Une conversion totale a été notée au bout d'une heure d'agitation à 0°C. Un seul produit est détecté par HPLC analytique. L'analyse LC-MS révèle la présence d'un ion moléculaire de masse $[M+H]^+ = 925$ qui pourrait correspondre au pseudo-dimère **108a** du composé attendu. Le solvant est évaporé à sec et le brut est purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (éluant DCM/EtOH 99:1). Le produit est isolé sous forme d'un solide violacé avec un rendement de 98%.

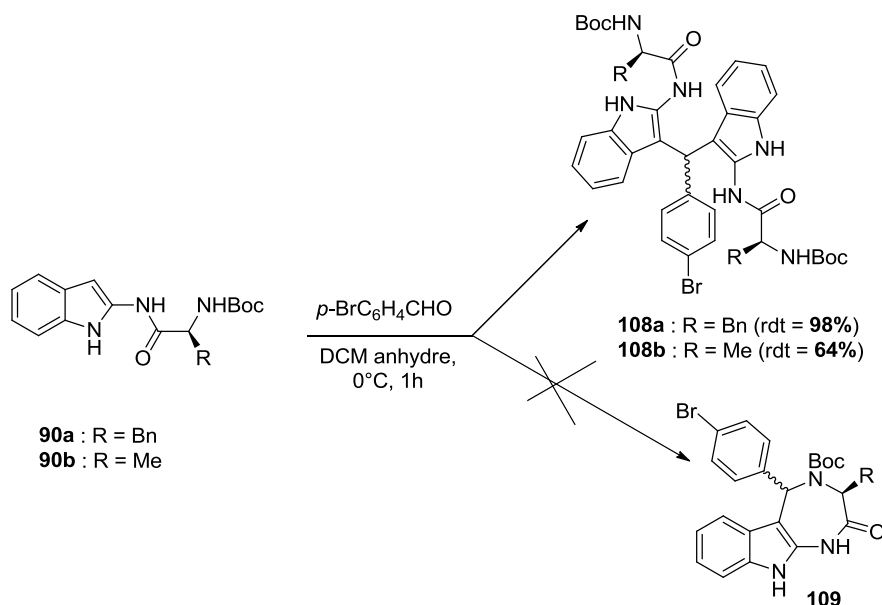


Schéma III- 81 : Condensation du dérivé protégé avec le *p*-bromobenzaldéhyde

Les expériences de spectroscopie RMN réalisées sur le produit confirment l'hypothèse de la formation du dérivé pseudo-dimérique **108**. Le même résultat est obtenu à partir du dérivé de l'alanine **90b**. Le produit **108b** est alors isolé avec un rendement de 64%.

La cyclisation de Pictet-Spengler à partir du dérivé 2-*N*-acyle-indole sous forme d'amine libre a alors étudiée.

V.3.2. Étude de la cyclisation à partir du dérivé amine libre

Pour explorer la cyclisation de Pictet-Spengler à partir du dérivé 2-*N*-acyle-indole **90a**, le groupement protecteur Boc a été tout d'abord éliminé, à l'aide d'une solution de DCM/TFA (1:1, v/v) pour obtenir l'intermédiaire amine **110a** avec un rendement de 95%.

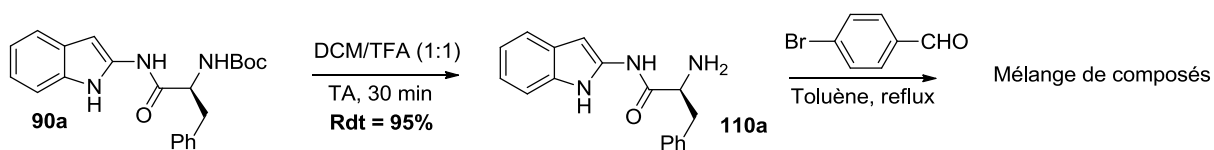


Schéma III- 82 : Déprotection du dérivé *N*-acylé et condensation avec le *p*-bromobenzaldéhyde

L'intermédiaire **110a** a été ensuite engagé dans une réaction de condensation avec le *para*-bromobenzaldéhyde dans le toluène dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la série thiophène décrite au laboratoire. Le mélange est agité à reflux du toluène pendant 3h. L'avancement de la réaction est suivi par CCM et HPLC. L'analyse par HPLC analytique à

214 nm indique la présence d'un mélange complexe. Une analyse LC-MS révèle la présence de plusieurs ions moléculaires ayant tous un atome de brome et de masse molaire identique ($[M+H]^+ = 446$). Cette masse correspond à la masse du produit attendu. Un autre composé de masse molaire 443 est également détecté. Les ions de m/z 446 pourraient correspondre au dérivé diazépinique **111a** dont la formation du cycle fait intervenir le carbone C-3, au dérivé triazépinique **111c** pour lequel la cyclisation a eu lieu sur l'azote indolique, et à l'intermédiaire imine non encore cyclisé **111b**. Le composé **111d** de m/z 444 pourrait provenir d'une suroxydation du composé cyclisé **111a**.

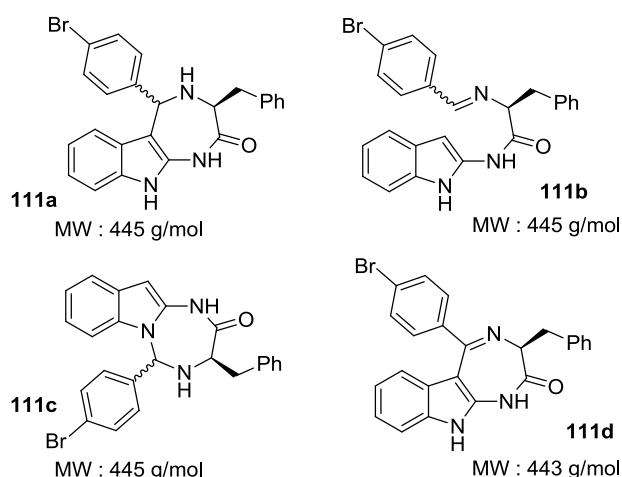


Schéma III- 83

Les tentatives de purification par colonne chromatographique sur gel de silice ou d'alumine n'ont pas permis de séparer les produits. En testant les conditions réactionnelles de K. S. Sudhir et *al.* (ie DCM/TFA 2%, TA), le même mélange complexe que précédemment est également obtenu (Schéma III- 83).

D'autres conditions opératoires ont alors été testées. Le toluène a été remplacé par le THF anhydre. Lorsque la réaction est réalisée à 0°C, on n'observe aucune réaction tandis qu'à 40°C, il y a une conversion totale du produit amine. Une analyse LC-MS révèle la présence de plusieurs composés dont deux, de masse molaire 445. Cette masse correspond à celle du produit désiré. Les autres produits n'ont pas pu être identifiés. Une purification du brut réactionnel par colonne chromatographique sur gel de silice (éluant : DCM/AcOEt 1/1 v/v) a permis d'isoler un des composés de masse molaire 445 g.mol⁻¹ avec un rendement de 20%. Les analyses par spectroscopie RMN montrent la disparition du singulet correspondant au proton H-3 de l'indole. De même, une analyse du spectre HSQC ¹H- ¹³C montre que le

carbone à 102,2 ppm, correspondant au C-3 indolique, est quaternaire. Enfin, une corrélation HMBC ^1H - ^{13}C met en évidence une corrélation longue distance entre le C-3 de l'indole (ou C-5a de la diazépine) et le H-5, prouvant que le composé isolé correspond bien à l'indolodiazépine désirée (Figure III- 30). La configuration du nouveau centre créé n'a pas été déterminée.

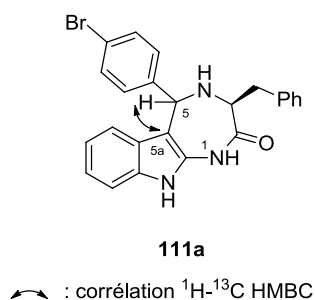


Figure III- 30 : Structure du composé isolé

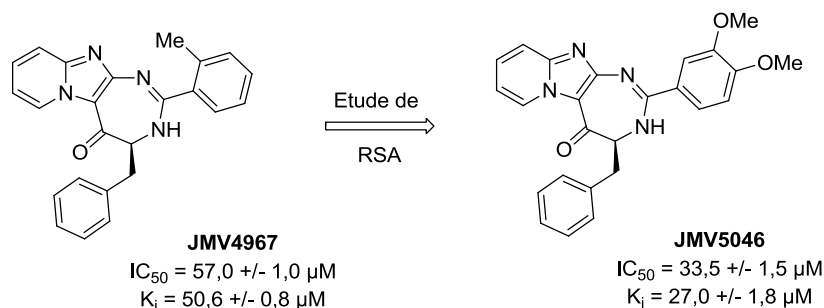
➤ Conclusion

Une méthode simple et efficace d'accès au synthon 2-amino-indole sous forme chlorhydrate a été mise au point. La réactivité de ce synthon a fait l'objet d'une étude dans le cadre de la réaction d'acylation avec un donneur d'acyle de type ester activé d'acide aminé. Contrairement à la 2-amino-IP où une C-acylation est observée, on assiste à une N-acylation dans le cas du 2-amino-indole. Le dérivé N-acylé a été utilisé par la suite pour l'étude de la réaction de cyclisation de Pictet-Spengler. L'étude de la condensation de Pictet-Spengler sur le dérivé N-acylé protégé, a montré que le C-3 indolique était plus réactif que l'azote de la fonction carbamate. Cette attaque, de la fonction carbonyle du dérivé aldéhydique par le C-3 indolique conduit à la formation d'un pseudo-dimère et non au produit cyclique souhaité. La cyclisation est possible lorsque la réaction est effectuée à partir du dérivé N-acylé déprotégé. Ainsi, à partir du dérivé 2-N-acyle-indole sous forme d'amine libre, un exemple de composé indolo[1,4]diazépin-2-one a pu être obtenu avec un faible rendement. Les conditions réactionnelles nécessitent d'être optimisées en vue d'obtenir des composés finaux avec des rendements satisfaisants. Il serait également utile d'étendre cette étude à d'autres acides aminés ainsi qu'à d'autres aldéhydes, afin d'accéder à une librairie originale de composés diazépiniques en série indole. Ces composés pourront alors faire l'objet d'une évaluation de leur activité sur la kallicréine 7.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Cette étude s'inscrit dans la continuité d'un projet récemment initié au laboratoire, sur la synthèse d'inhibiteurs de la kallicréine 7. Notre travail a consisté en la synthèse d'inhibiteurs réversibles et sélectifs de la KLK7. A ce titre, quatre séries de composés ont été explorées.

La première série est issue d'un criblage de molécules pyrido-imidazodiazépinones, qui a permis d'identifier un inhibiteur réversible et sélectif de la KLK7, le JMV4967, qui présente une constante d'inhibition (K_i) de 50 μM . Le JMV4967 est caractérisé par la présence, sur le sommet 2 du cycle diazépinique, d'un noyau phényle substitué en *ortho* par un groupement méthyle. A partir de ce premier hit, nous avons étudié successivement l'influence sur l'activité inhibitrice, des substituants présents sur les positions 2, 3, 4 et 5 du cycle diazépinique. De même, l'impact de la stéréochimie du carbone 4 du cycle diazépine et "l'ouverture" de ce cycle à sept chaînons a également été étudiée. Cette étude de relations structure-activité (RSA) a montré que seule la position 2 du cycle diazépinique pouvait être modifiée, toutes les autres modulations conduisant à une perte de l'activité. Ces travaux ont permis l'identification du composé JMV5046, qui possède un K_i de 27,0 μM , quasiment deux fois plus actif que le JMV4967.

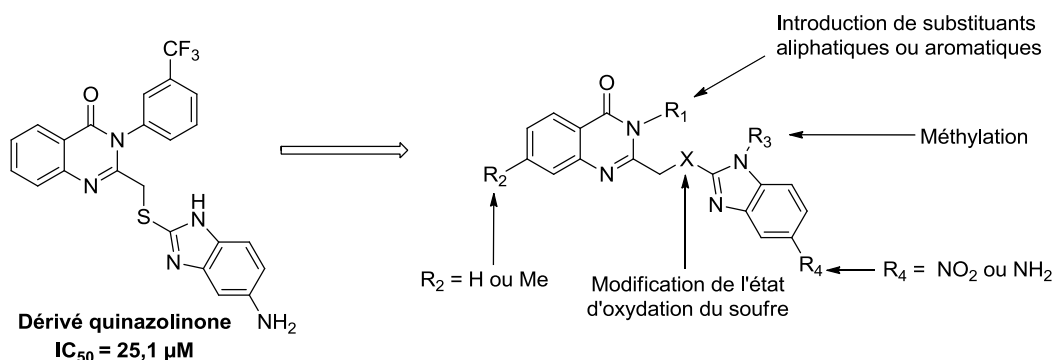


Une étude biochimique du JMV5046, a mis en évidence son caractère réversible, et compétitif vis-à-vis du substrat dans le site actif de la KLK7, comme le hit initial. De plus, ce composé s'est révélé être sélectif de la KLK7 parmi les 4 protéases testées (KLK5, 7, 8 et 14). La structure chimique du JMV5046 se caractérise par la présence, en position 2 du cycle diazépinique, d'un groupement 3,4-diméthoxyphényle. Des expériences de modélisation moléculaire par docking, ont permis de proposer un modèle hypothétique de positionnement de l'inhibiteur dans la poche enzymatique. D'après ce modèle, le composé JMV5046 établit des liaisons hydrogène avec trois acides aminés de l'enzyme, dont la sérine catalytique

Ser195. De plus, les noyaux benzyle et imidazo[1,2-*a*]pyridine occuperaient respectivement la poche S2 et S1' du site actif de la KLK7. A ce stade, il conviendrait de valider ce modèle *in silico* par des données expérimentales de co-cristallographie, pour envisager une optimisation rationnelle du JMV5046.

Par ailleurs, une évaluation de l'activité cytotoxique éventuelle des composés a été réalisée sur quatre lignées cellulaires différentes. Aucune toxicité particulière vis-à-vis des cellules saines HEK-293 n'a été mise en évidence d'une part. D'autre part, le JMV5046 a montré une faible activité cytotoxique vis-à-vis des lignées cancéreuses HeLa et HaCat. Cependant, il reste difficile à ce stade, de relier l'activité cytotoxique du composé, à son pouvoir inhibiteur de la KLK7.

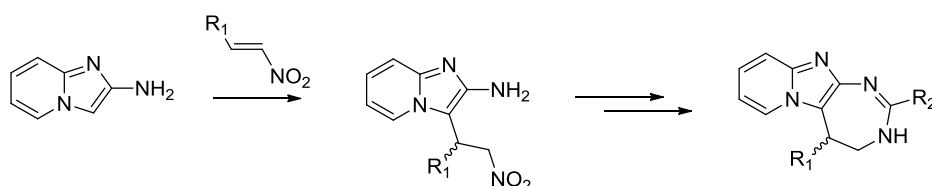
La seconde série a été développée à partir d'une quinazoline substituée par un amino-benzimidazole. Une étude de RSA a également été menée, mais les composés développés n'ont pas permis d'améliorer l'activité de la molécule de référence.



Les études de docking effectuées avec le composé de référence, semblent indiquer que la position 7 de la partie quinazolinone de l'inhibiteur, est orientée vers le fond de la poche enzymatique, occupée par l'asparagine Asn189 (distance d'environ 3 Å). Il serait donc intéressant d'étudier des analogues en série pyridopyrimidone, en vue d'établir une liaison hydrogène supplémentaire, entre l'inhibiteur et les résidus de la poche enzymatique, et en particulier avec l'Asn189.

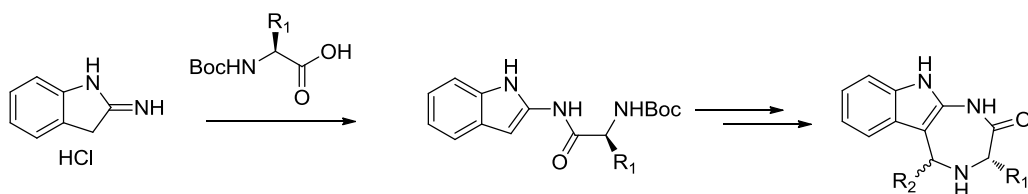
Les deux autres séries ont été développées dans le cadre d'une étude de réactivité chimique. Cette étude a été entreprise afin d'accéder à deux nouvelles séries de composés diazépiniques fusionnés avec l'imidazo[1,2-*a*]pyridine ou l'indole. L'étude a montré que la 2-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridine pouvait subir une alkylation en position 3 du cycle, dans le cadre de la réaction de nitro-Michael. Les produits d'addition de Michael ainsi formés ont permis, après réduction du groupement nitro, d'accéder à deux dérivés diazépiniques

correspondants avec des rendements faibles. Une optimisation des conditions réactionnelles devra alors être entreprise, et cette réaction étendue, en vue d'accéder à une librairie de dérivés diazépiniques originaux.



De plus, une étude du contrôle du centre asymétrique créé lors de l'addition de nitro-Michael a été initiée, afin d'accéder à des composés énantiomériquement purs ou enrichis. Neuf catalyseurs chiraux ont été évalués dans le cadre de cette étude. Cependant, les premiers essais n'ont pas permis d'obtenir une énantiosélectivité significative. Il serait utile de poursuivre les études d'induction de chiralité, pour essayer d'obtenir une énantiosélectivité effective, en modifiant par exemple le substrat de la réaction ou la nature du catalyseur.

Par ailleurs, l'étude de la réactivité chimique du 2-amino-indole, a montré qu'en présence d'un donneur d'acyle de type ester activé d'acide aminé, l'acylation du 2-amino-indole conduisait aux dérivés *N*-acylés correspondants, contrairement à ce qui est observé dans le cas de la 2-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridine, dans des conditions réactionnelles similaires. Ces derniers ont ensuite permis la synthèse d'un exemple de dérivé indolodiazépinique, en utilisant la réaction de condensation de Pictet-Spengler.



Ces travaux pourraient être poursuivis, en optimisant les conditions réactionnelles, afin d'accéder à une librairie originale de composés diazépiniques en série indole. Ces composés pourront alors faire l'objet d'une évaluation de leur activité inhibitrice sur la kallicréine 7.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

VI. CONDITIONS EXPÉRIMENTALES GÉNÉRALES

Les matières premières, lorsqu'elles sont commercialement disponibles, ont été fournies par Sigma Aldrich et Alfa Aesar. Tous les réactifs commerciaux et solvants ont été utilisés sans purification. L'avancement des réactions a été suivi par HPLC : système Waters (colonne Chromolith Speed Rd RP-C18 185 Pm 50 x 4,6 mm ; 5 μ m) : Solvant A = Eau/0,1%TFA ; solvant B = Acétonitrile/0,1%TFA ; gradient = 0% de B à 100% de B en 5,5 min ; débit = 3,0 mL.min⁻¹. Détection UV à 214 nm. Les analyses chromatographiques sur couche mince ont été réalisées avec des plaques en feuilles d'aluminium 20x20 cm recouvertes d'une couche de silice 60 F₂₅₄ ou d'alumine 60 F₂₅₄ neutre de 0,2 mm d'épaisseur (Merck KGaA, 64721 Darmstadt, Germany). Les purifications par colonne chromatographiques ont été réalisées avec de la silice Marchery-nagel, 60M, 0,04-0,063 mm ou de l'oxyde d'aluminium 90 standardisé (Merck KGaA, 64721 Darmstadt, Germany). Les spectres de masses ESI-MS (+) ont été réalisés sur un système HPLC WATERS 2690 Alliance équipé d'un détecteur Quattro Micro (Micromass Manchester UK) et d'une colonne Chromolith Speed Rod RP-C18 185 Pm column (50 x 4,6 nm, 5 μ m) : solvant A = Eau/0,1%Acide Formique ; solvant B = Acétonitrile/0,1% Acide Formique ; gradient 0% de B à 100% de B en trois minutes ; débit : 3,0 mL.min⁻¹. Les analyses spectrométriques de masse haute résolution (HRMS) ont été réalisées avec un spectromètre à temps de vol, équipé d'une source d'ionisation electrospray (ESI). Toutes les mesures ont été effectuées en mode d'ionisation positif. Les spectres RMN ont été enregistrés sur les appareils BRUKER 300 (¹H = 300 MHz ; ¹³C = 75 MHz) et BRUKER 400 (¹H = 400 MHz ; ¹³C = 100 MHz) 5mm QNP. Les déplacements chimiques sont donnés en partie par million par rapport au solvant : [¹H : δ (CDCl₃) : 7,26 ppm ; (DMSO-*d*₆) = 2,50 ppm ; (CD₃OD) = 3,31 ppm ; ¹³C : δ (CDCl₃) : 77,2 ppm ; (DMSO-*d*₆) = 39,50 ppm ; (CD₃OD) = 49,0 ppm]. Les abréviations suivantes sont utilisées pour désigner les multiplicités des signaux : s (singulet), bs (signal élargi), d (doublet), dd (doublet dédoublé), t (triplet), dt (doublet détriplé), td (triplé dédoublé), m (multiplet). Les spectres infrarouges ont été enregistrés sur un spectromètre Perkin Elmer spectrum 100 FT-IR équipé d'un système ATR. Les points de fusions ne sont pas corrigés, et ont été déterminés avec un appareil de point de fusion capillaire (*STUART melting pot, model*

SMP3). Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés à l'aide d'un polarimètre Perkin Elmer 341 avec une cuve de 1 dm de longueur à une température de 20°C. La raie D de sodium à 589 nm a été utilisée comme source de lumière monochromatique. Les pouvoirs rotatoires spécifiques ont été calculés grâce à la loi de Biot :

$$[\alpha]_D = \alpha / (l \times c)$$

avec $[\alpha]_D$: pouvoir rotatoire spécifique du composé,

α : pouvoir rotatoire algébrique du composé (mesuré en degré)

c : concentration du composé en solution (g.cm^{-3})

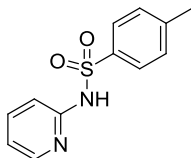
l : longueur de la cuve en dm

Les valeurs des pouvoirs rotatoires spécifiques sont décrites, accompagnées de la température à laquelle la mesure a été réalisée, de la concentration du composé en solution, et du solvant utilisé.

VII. Protocoles expérimentaux

VII.1. Synthèse des composés

Composé 1 : 4-méthyl-N-(pyridin-2-yl)benzènesulfonamide.

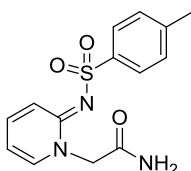


A une solution de 10,0 g de 2-aminopyridine (106,0 mmol) dans 60 mL de pyridine, est ajouté du chlorure de tosylo (20,2 g, 106 mmol). La solution est agitée pendant 24h à 90°C.

Après refroidissement, la pyridine est évaporée sous pression réduite. Le résidu est mis en suspension dans 400 mL d'eau distillée et laissé sous agitation à température ambiante pendant une heure. La suspension est filtrée sous vide et le produit est obtenu sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 93%.

HPLC, Tr = 1,36 min. Données structurales similaires à la littérature.³²⁶

Composé 2 : 2-(2-(tosylimino)pyridin-1(2H)-yl)acétamide.

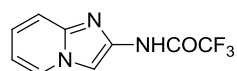


A une suspension du composé 1 (10,0 g, 40,3 mmol) dans du DMF, sont ajoutés de la diisopropyléthylamine (7,7 mL, 44,7 mmol, 1,1 éq) et du 2-iodoacétamide (8,2 g, 44,4 mmol, 1,1 éq). La solution est agitée pendant 24h à température ambiante.

Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite. Le résidu est précipité dans 250 mL d'eau distillée, sous agitation pendant une heure à température ambiante. Après filtration sous vide et séchage, le composé **2** est obtenu sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 93%.

Solide blanc, m = 11,40 g, 93% ; ^1H RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz) : δ ppm 2,33 (s, 1H), 4,83 (s, 2H), 6,72 (t, 1H, $J = 6,8$ Hz), 7,27 (m, 3H), 7,37 (bs, 1H), 7,66 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz), 7,71 (dd, 1H, $J = 8,5, 6,8$ Hz), 7,79 (bs, 1H), 7,99 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz) ; ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 75 MHz) : δ ppm 20,9, 54,3, 110,7, 116,1, 126,0, 129,1, 140,9, 141,2, 141,5, 142,3, 155,3, 167,5 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3174, 1697, 1503, 1368, 1132, 1081, 982, 767 ; HPLC, Tr = 0,97 min ; MS (ESI+) : m/z 289,2 $[\text{M}+\text{NH}_3]^+$, 306,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 611,4 $[\text{M}+2\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ 306,0912, trouvé 306,0915.

Composé 3 : 2,2,2-trifluoro-N-(imidazo[1,2-a]pyridin-2-yl)acétamide.



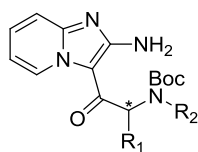
Une solution de 5,4 g du composé **2** (17,7 mmol) dans 55 mL de DCM anhydre est refroidie à 0°C dans un bain de glace.

Deux équivalents d'anhydride trifluoroacétique (4,9 mL; 35,1 mmol) sont ajoutés par fraction. La solution est agitée pendant 6h, sous atmosphère d'argon, à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite lavé avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium, séché sur sulfate de sodium anhydre, filtré et évaporé sous pression réduite. Le composé **3** est obtenu sous la forme d'une poudre beige claire avec un rendement de 88%.

Poudre beige clair, m = 3,56 g ; 88% ; pf : 154-158°C.

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) : δ ppm 5,56 (bs, 1H), 6,90 (dd, 1H, $J = 6,9$ Hz, $J = 7,8$ Hz), 7,28 (dd, 1H, $J = 9,1$ Hz, $J = 7,8$ Hz), 7,49 (d, 1H, $J = 9,1$ Hz), 8,16 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz), 8,18 (s, 1H) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) : δ ppm 102,9, 113,3, 114,0, 114,3, 116,3, 117,8, 126,0, 126,2, 130,3, 133,0, 139,3, 142,0, 154,9 ; ^{19}F RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ ppm -74,8 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3174, 1697, 1630, 1502, 1461, 1368, 1252, 1131, 1080, 982, 767 ; HPLC, Tr = 1,08 min ; MS (ESI+) : m/z 230,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_9\text{H}_6\text{F}_3\text{N}_3\text{O}$ 230,0541, trouvé 230,0541.

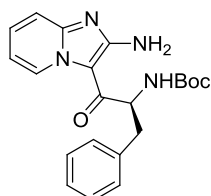
Procédure générale de synthèse des composés **5a-r** (dérivés Boc)



A une suspension du composé **3** (500 mg, 2,18 mmol) dans 9 mL de soude 5N, on ajoute 1 mL de THF. La solution est agitée pendant 4h à 40°C et extraite avec du DCM (3x20 mL).

La phase organique est séchée avec du sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le composé **4** est obtenu sous forme d'une huile. Du fait de son instabilité, il est immédiatement engagé dans l'étape suivante. Le composé **4** est mis en solution dans 10 mL de DCM puis refroidit à 0°C. Sont ajoutés, 1,1 équivalent de Boc-AA-OH, 460 mg d'EDCI (2,4 mmol ; 1,1 éq.), 367 mg d'1-hydroxybenzotriazole monohydraté (2,4 mmol ; 1,1 éq.) et 335 μ L de triéthylamine (2,4 mmol ; 1,1 éq.). Le mélange est agité à 0°C pendant 30 mn puis à température ambiante pendant 4h. La phase organique est lavée avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium, séchée avec du sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié par colonne chromatographique d'alumine (éluant : DCM puis DCM/EtOH 99:1 v/v). Les composés **5a à r** sont isolés avec des rendements variant entre 28 et 97%.

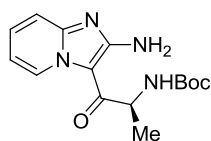
Composé 5a : (2S)-2-Boc-amino-1-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-3-phénylpropan-1-one.



Solide blanc ; m = 1,460 g, 88% ; pf : 182-184°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +54,2$ (*c* 1,0, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 1,36 (s, 9H), 3,10 (ABX, 2H), 5,27 (m, 1H), 5,98 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz), 6,11 (bs, 1H), 6,84 (dd, 1H, *J* = 6,3 Hz, *J* = 7,8 Hz), 7,15 (m, 5H), 7,35 (m, 2H), 9,62 (bs, 1H) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 28,4, 38,7, 55,5, 80,5, 108,3, 113,0, 114,3, 126,7, 128,4, 129,3, 129,4, 130,7, 137,0, 147,8, 156,7, 158,8, 184,9 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 3329, 3195, 2974, 1682, 1576, 1542, 1495, 1453, 1342, 1287, 1164, 1045, 750 ; HPLC, Tr = 1,70 min ; MS (ESI⁺) : *m/z* 381,2 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₂₁H₂₅N₄O₃ 381,1927, trouvé 381,1930.

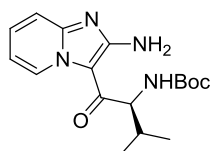
Composé 5b : (2S)-2-Boc-amino-1-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-3-propan-1-one.



Solide blanc, m = 0,848 g, 64%, pf : 160-162°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = -69,8^\circ$ (c 1,0, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 1,40 (s, 3H), 1,42 (s, 9H), 5,03 (quint, 1H, $J = 7,2$ Hz), 5,65 (d, 1H, $J = 7,2$ Hz), 5,97 (bs, 1H), 6,88 (t, 1H, $J = 6,8$ Hz), 7,39 (m, 2H), 9,60 (bs, 1H) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 18,5, 28,5, 50,3, 80,4, 107,6, 113,2, 114,4, 129,4, 130,7, 147,8, 156,4, 158,6, 185,9 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 3388, 3203, 2982, 1678, 1630, 1591, 1522, 1499, 1444, 1343, 1329, 1309, 1288, 1267, 1167, 1054, 853, 758, 743 ; HPLC, Tr = 1,13 min ; MS (ESI⁺) : m/z 305,2 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₁₅H₂₁N₄O₃ 305,1614, trouvé 305,1613.

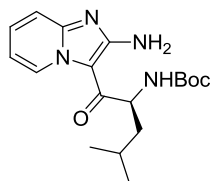
Composé 5c : (2S)-2-Boc-amino-1-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-3-méthylbutan-1-one.



Solide blanc, m = 0,520 g, 72%, pf : 214-215°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = -3,8^\circ$ (c 1,0, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) : δ ppm 0,92 (d, 3H, $J = 6,4$ Hz), 1,03 (d, 3H, $J = 6,4$ Hz), 1,44 (s, 9H), 2,19 (sept, 1H, $J = 6,4$ Hz), 4,64 (m, 1H), 5,39 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz), 6,02 (bs, 2H), 6,90 (t, 1H, $J = 6,9$ Hz), 7,38 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz), 7,44 (dd, 1H, $J = 8,7$ Hz, 6,9 Hz), 9,68 (bs, 1H) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 19,6, 28,3, 31,0, 60,2, 80,3, 108,6, 113,2, 114,2, 129,2, 130,7, 137,1, 147,3, 157,0, 158,4, 186,2 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 3388, 3207, 2968, 1678, 1576, 1500, 1445, 1348, 1299, 1271, 1252, 1171, 1065, 1011, 813, 760 ; HPLC, Tr = 1,18 min ; MS (ESI⁺) : m/z 333,0 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₁₇H₂₅N₄O₃ 333,1927, trouvé 333,1935.

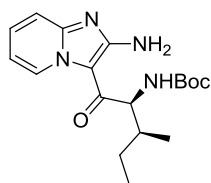
Composé 5d : (2S)-2-Boc-amino-1-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-3-isopropylpropan-1-one.



Solide blanc, m = 0,536 g, 71%, pf : 176°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = -13,5^\circ$ (*c* 1,0, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) : δ ppm 0,93 (m, 6H), 1,42 (s, 9H), 1,58 (m, 2H), 1,71 (q, 1H, *J* = 6,8 Hz), 5,05 (m, 1H), 5,35 (d, 1H, *J* = 9,4 Hz), 6,14 (bs, 2H), 6,89 (t, 1H, *J* = 6,9 Hz), 7,37 (d, 1H, *J* = 8,6 Hz), 7,43 (dd, 1H, *J* = 8,6, 6,9 Hz), 9,65 (bs, 1H) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 22,8 (2C), 25,0, 28,4, 42,0, 52,5, 80,5, 108,2, 113,3, 114,3, 129,4, 130,9, 147,5, 156,9, 158,8, 186,4 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 3346, 3203, 2975, 2949, 1686, 1586, 1540, 1496, 1452, 1340, 1279, 1163, 1065, 760 ; HPLC, Tr = 1,49 min ; MS (ESI⁺) : *m/z* 347 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₁₈H₂₇N₄O₃ 347,2083, trouvé 347,2079.

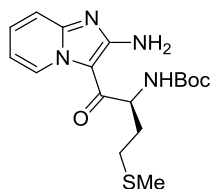
Composé 5e : (2*S*, 3*S*)-2-Boc-amino-1-(2-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)-3-méthylpentan-1-one.



Solide blanc, *m* = 0,649 g, 86%, pf : 197°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +9,1^\circ$ (*c* 1,0, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) : δ ppm 0,90 (t, 3H, *J* = 8,0 Hz), 1,22 (m, 1H), 1,41 (s, 1H), 1,42 (m, 3H), 1,63 (m, 1H), 1,96 (m, 1H), 4,72 (t, 1H, *J* = 9,8 Hz), 5,46 (d, 1H, *J* = 9,8 Hz), 6,06 (bs, 2H), 6,87 (t, 1H, *J* = 6,7 Hz), 7,36 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz), 7,41 (dd, 1H, *J* = 8,8, 6,7 Hz), 9,65 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 10,9, 15,8, 25,2, 28,4, 37,3, 58,7, 80,4, 108,9, 113,2, 114,3, 129,3, 130,7, 147,7, 157,2, 158,9, 186,5 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 3396, 3209, 2965, 2930, 1676, 1582, 1499, 1446, 1349, 1270, 1164, 1013, 763, 749 ; HPLC, Tr = 1,46 min ; MS (ESI⁺) : *m/z* 347,2 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₁₈H₂₇N₄O₃ 347,2083, trouvé 347,2077.

Composé 5f : (S)-tert-butyl (1-(2-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)-4-(méthylthio)-1-oxobutan-2-yl)carbamate.

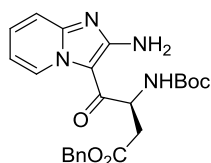


Solide blanc, *m* = 0,550 g, 69%, pf : 165-167°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +1,36^\circ$ (*c* 1,4, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) : δ ppm 1,42 (s, 9H), 1,94 (m, 1H), 2,07 (m, 1H), 2,10 (s, 3H), 2,58 (dd, 2H, *J* = 7,3, 5,9 Hz), 5,09 (m, 1H), 5,69 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz), 6,08 (bs, 2H), 6,88 (t, 1H, *J* = 6,8 Hz), 7,36 (d, 1H, *J* = 8,6 Hz), 7,42 (dd, 1H, *J* =

8,6, 6,8 Hz), 9,66 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) : δ ppm 15,9, 28,4, 30,7, 32,9, 53,6, 80,5, 107,7, 113,2, 114,3, 129,6, 131,0, 147,9, 156,6, 158,3, 184,8 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3172, 2977, 1710, 1679, 1575, 1524, 1497, 1443, 1265, 1164, 1043, 757 ; HPLC, Tr = 1,34 min ; MS (ESI^+) : m/z 365,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ 365,1647, trouvé 365,1638.

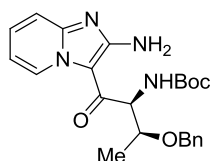
Composé 5g : (S)-benzyl 4-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-4-oxobutanoate.



Solide beige, m = 0,860 g, 93%, pf : 125°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -47,2^\circ$ (c 0,5, CHCl_3) ; ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) : δ ppm 1,38 (s, 9H), 2,72 (dd, 1H, $J = 15,8, 6,2$ Hz), 2,93 (d, 1H, $J = 15,8, 6,2$ Hz), 5,08 (2H, m), 5,29 (m, 1H), 5,76 (d, 1H, $J = 9,3$ Hz), 6,08 (bs, 2H), 6,83 (dd, 1H, $J = 7,7, 6,4$ Hz), 7,25 (m, 4H), 7,31 (m, 2H), 7,40 (dd, 1H, $J = 8,3, 7,7$ Hz), 9,52 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) : δ ppm 28,4, 37,6, 51,8, 67,0, 80,9, 107,5, 113,4, 114,1, 127,1, 128,4, 128,6, 129,7, 131,2, 135,5, 147,6, 156,3, 158,1, 171,2, 182,6 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3407, 3315, 2918, 2850, 1729, 1586, 1496, 1452, 1339, 1264, 1198, 1167, 1054, 762, 747, 697 ; HPLC, Tr = 1,6 min ; MS (ESI^+) : m/z 439,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_5$ 439,1981, trouvé 439,1993.

Composé 5h : (2S,3S)-2-Boc-amino-1-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-3-benzyloxybutan-1-one.

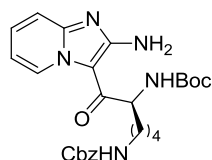


Solide blanc, m = 1,140 g, 62%, pf : 126-128°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -4,8^\circ$ (c 1,0, CHCl_3) ; ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) : δ ppm 1,25 (d, 3H, $J = 6,2$ Hz), 1,43 (s, 9H), 4,07 (m, 1H), 4,44 (d, 1H, $J = 11,4$ Hz), 4,64 (d, 1H, $J = 11,4$ Hz), 5,10 (dd, 1H, $J = 8,4, 5,1$ Hz), 5,86 (bs, 2H), 6,85 (dd, 1H, $J = 7,2, 6,6$ Hz), 7,24 (m, 5H), 7,31 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 7,38 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz), 9,62 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) : δ ppm 15,7, 28,5, 59,0, 74,6, 76,6, 80,1, 113,1, 114,4, 127,8, 127,9, 128,0, 128,5, 129,5, 130,7, 137,7, 147,8, 156,2, 158,9, 183,0 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3386, 3203, 2979, 1677, 1590, 1498, 1444,

1343, 1287, 1268, 1164, 1054, 1019, 759, 742 ; HPLC, Tr = 1,57 min ; MS (ESI⁺) : m/z 425,2 [M+H]⁺; HRMS calculé pour C₂₃H₂₉N₄O₄ 425,2189, trouvé 425,2184.

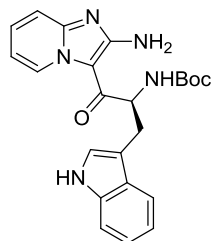
Composé 5i : (S)-benzyl tert-butyl (6-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-6-oxohexane-1,5-diyl)dicarbamate .



Solide blanc, m = 1,050 g, 97%, pf : 96°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +2,4^\circ$ (c 1,0, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) : δ ppm 1,22 (t, 1H, J = 7,0 Hz), 1,38 (s, 9H), 1,46 (m, 2H), 1,76 (m, 1H), 1,91 (m, 1H), 2,26 (m, 1H), 3,05 (m, 2H), 4,62 (bs, 1H), 5,01 (m, 1H), 5,11 (m, 2H), 6,05 (bs, 2H), 6,37 (bs, 1H), 6,85 (ddd, 1H, J = 6,7 Hz, 8,0 Hz, 1,5 Hz), 7,30-7,40 (m, 7H), 9,64 (bs, 1H) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 22,9, 28,5, 29,8, 32,3, 40,2, 58,3, 67,4, 79,2, 108,2, 113,3, 114,3, 128,2, 128,3, 128,6, 129,5, 131,0, 136,1, 147,9, 156,1, 157,4, 158,7, 185,2 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 3319, 3214, 2932, 2853, 1687, 1521, 1496, 1445, 1341, 1165, 1040, 1011, 760, 696 ; HPLC, Tr = 1,59 min ; MS (ESI⁺) : m/z 496 [M+H]⁺; HRMS calculé pour C₂₆H₃₄N₅O₅ 496,2560, trouvé 496,2568.

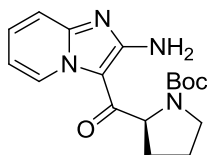
Composé 5j : (S)-tert-butyl (1-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-3-(1H-indol-3-yl)-1-oxopropan-2-yl)carbamate.



Solide blanc, m = 0,580 g, 64%, pf : 196°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +77,9^\circ$ (c 1,0, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 1,30 (s, 9H), 2,40 (bs, 1H), 3,13 (dd, 1H, J = 14,8, 7,0 Hz), 3,29 (dd, 1H, J = 14,8 Hz, 7,0 Hz), 5,36 (t, 1H, J = 7,0 Hz), 5,80 (bs, 1H), 6,70 (bs, 2H), 6,94 (m, 2H), 7,03 (dd, 1H, J = 7,1, 8,1 Hz), 7,14-7,25 (m, 3H), 7,51 (d, 1H, J = 7,7 Hz), 8,35 (bs, 1H), 9,52 (bs, 1H) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 28,4, 28,6, 55,0, 80,4, 108,4, 110,9, 111,2, 113,0, 114,2, 118,7, 119,5, 122,0, 122,8, 127,6, 129,4, 130,6, 136,2, 147,6, 156,6, 158,6, 185,4 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 3213, 2975, 1682, 1544, 1494, 1449, 1340, 1161, 1011, 761, 737 ; HPLC, Tr = 1,46 min ; MS (ESI⁺) : m/z 420 [M+H]⁺; HRMS calculé pour C₂₃H₂₆N₅O₃ 420,2036, trouvé 420,2030.

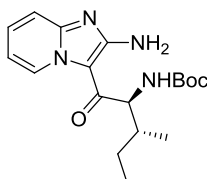
Composé 5k : (S)-tert-butyl 2-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridine-3-carbonyl)pyrrolidine-1-carbamate.



Solide blanc, m = 1,270 g, 88%, pf : 184-186°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +56,2^\circ$ (c 1,0, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 1,43 (s, 9H), 1,90-2,11 (m, 3H), 2,30 (m, 1H), 3,45-3,70 (m, 2H), 5,13 (dd, 1H, $J = 7,7, 3,0$ Hz), 6,83 (t, 1H, $J = 6,5$ Hz), 6,90 (bs, 1H), 7,34 (m, 3H), 9,50 (bs, 1H) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 24,9, 28,5, 30,6, 47,5, 60,2, 80,1, 109,0, 112,9, 114,3, 128,9, 130,1, 147,3, 155,4, 158,8, 188,1 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 3139, 2977, 1678, 1592, 1495, 1446, 1403, 1344, 1161, 1125, 1051, 756 ; HPLC, Tr = 1,39 min ; MS (ESI⁺) : m/z 331,2 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₁₇H₂₃N₄O₃ 331,1770, trouvé 331,1768.

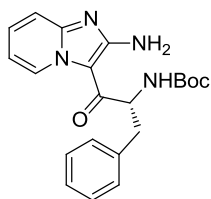
Composé 5l : (2S, 3R)-2-Boc-amino-1-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-3-méthylpentan-1-one.



Solide blanc, m = 0,670 g, 89%, pf : 197°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = -9,4^\circ$ (c 1,0, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) : δ ppm 0,90 (t, 3H, $J = 8,0$ Hz), 1,22 (m, 1H), 1,41 (s, 1H), 1,42 (m, 3H), 1,63 (m, 1H), 1,96 (m, 1H), 4,72 (t, 1H, $J = 9,8$ Hz), 5,46 (d, 1H, $J = 9,8$ Hz), 6,06 (bs, 2H), 6,87 (t, 1H, $J = 6,7$ Hz), 7,36 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 7,41 (dd, 1H, $J = 8,8, 6,7$ Hz), 9,65 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 10,9, 15,8, 25,2, 28,4, 37,3, 58,7, 80,4, 108,9, 113,2, 114,3, 129,3, 130,7, 147,7, 157,2, 158,9, 186,5 ; FT-IR: γ_{\max} (cm⁻¹) : 3396, 3209, 2965, 2930, 1676, 1582, 1499, 1446, 1349, 1270, 1164, 1013, 763, 749 ; HPLC, Tr = 1,46 min ; MS (ESI⁺) : m/z 347,2 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₁₈H₂₇N₄O₃ 347,2083, trouvé 347,2077.

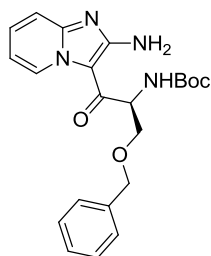
Composé 5m : (2R)-2-Boc-amino-1-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-3-phénylpropan-1-one.



Solide blanc ; m = 1,400 g, 85% ; mp = 182-184°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = -54,8$ (c 1,0, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 1,36 (s, 9H), 3,10 (ABX, 2H), 5,27 (m, 1H), 5,98 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 6,11 (bs, 1H), 6,84 (dd, 1H, $J = 6,3$ Hz, $J = 7,8$ Hz), 7,15 (m, 5H), 7,35 (m, 2H), 9,62 (bs, 1H) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 28,4, 38,7, 55,5, 80,5, 108,3, 113,0, 114,3, 126,7, 128,4, 129,3, 129,4, 130,7, 137,0, 147,8, 156,7, 158,8, 184,9 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 3329, 3195, 2974, 1682, 1576, 1542, 1495, 1453, 1342, 1287, 1164, 1045, 750 ; HPLC, Tr = 1,70 min ; MS (ESI⁺) : m/z 381,2 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₂₁H₂₅N₄O₃ 381,1927, trouvé 381,1930.

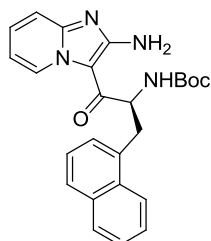
Composé 5n : (2S)-2-Boc-amino-1-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-3-benzyloxy-propan-1-one



Solide jaune, m = 0,244, 27%, pf : 124,0-124,6°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +3,66^\circ$ (c 3,66, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 1,46 (s, 9H), 3,77 (dt, 1H, $J = 8,5$, $J = 15,0$ Hz), 3,89 (dd, 1H, $J = 7,8$, $J = 2,4$ Hz), 4,54 (s, 2H), 5,30 (bs, 1H), 5,90 (s, 2H), 6,91 (t, 1H, $J = 13,5$, $J = 7,0$ Hz), 7,26 – 7,43 (m, 8H), 9,64 (bs, 1H) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 28,4, 54,1, 71,7, 73,6, 80,2, 109,1, 113,1, 114,3, 127,9, 127,7, 127,9, 128,4, 129,4, 130,7, 137,2, 147,8, 155,8, 159,1, 184,1 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 3356, 3204, 2970, 2849, 1678, 1631, 1578, 1456, 1297, 1163, 1057, 985, 763, 699 ; HPLC, Tr = 1,71 min ; MS (ESI⁺) : m/z 411,3 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₂₂H₂₇N₄O₄ 411,2032, trouvé 411,2035.

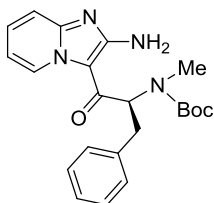
Composé 5o : (2S)-2-Boc-amino-1-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-3-(1-naphtyl)propan-1-one.



Solide jaune, m = 0,297 g, 63,5%, pf : 208,0-210,2°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +3,6^\circ$ (c 0,5, DMSO) ; ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) : δ ppm 1,30 (s, 9H), 3,55 (dd, 2H, $J = 10,5, 7,6$ Hz), 5,44 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz), 5,65 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz), 5,81 (bs, 2H), 6,83 (bs, 1H), 7,28 (m, 8H), 7,62 (d, 1H, $J = 6,9$ Hz), 7,75 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz), 8,11 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz), 9,55 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) : δ ppm 28,1, 35,6, 54,7, 80,3, 113,0, 113,9, 115,8, 123,3, 125,2, 125,5, 126,2, 127,3, 127,5, 128,7, 129,2, 130,7, 132,1, 132,7, 133,7, 147,2, 156,4, 158,2, 184,8 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3329, 3189, 2971, 1679, 1588, 1497, 1449, 1366, 1342, 1253, 1162, 1055, 762 ; HPLC, Tr = 1,81 min ; MS (ESI^+) : m/z 431,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_3$ 431,2083, trouvé 431,2085.

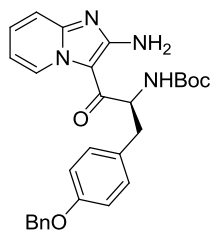
Composé 5p : (2S)-2-Boc-N-méthylamino-1-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-3-phénylpropan-1-one.



Solide jaune, m = 0,578 g, 67%, pf : 58,5 – 61,4°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = -164,9^\circ$ (c 1,05, CHCl_3) ; ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) : δ ppm 1,31 (s, 9H), 2,83 (s, 3H), 3,12 (m, 2H), 5,63 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 6,27 (s, 2H), 6,82 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,14 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,22-7,29 (m, 5H), 7,37 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 9,75 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) : δ ppm 28,2, 29,7, 34,5, 59,2, 81,0, 108,5, 112,9, 113,9, 116,1, 126,5, 128,4, 129,2, 129,4, 129,8, 130,8, 137,5, 147,8, 157,7, 158,1, 182,3 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3331, 3216, 2974, 2928, 1666, 1627, 1591, 1524, 1496, 1444, 1387, 1366, 1341, 1264, 1140, 1060, 1012, 951, 849, 760, 697 ; HPLC, Tr = 3,36 min ; MS (ESI^+) : m/z 395,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_3$ 395,2083, trouvé 395,2081.

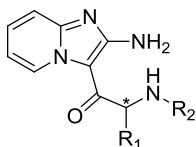
Composé 5q : (2S)-2-Boc-amino-1-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-3-(4-benzyloxyphényl)propan-1-one.



Solide jaune pale, m = 0,561 g, 53 %, pf : 108,1 – 120,0°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +64,08^\circ$ (c 0,76, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 1,36 (s, 9H), 2,95 (dd, 1H, $J = 15,0, 9,0$ Hz), 3,11 (dd, 1H, $J = 15,0, 9,0$ Hz), 4,95 (s, 2H), 5,48 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz), 5,86 (bs, 1H), 6,81 (m, 3H), 7,10 (d, 2H, $J = 9,0$ Hz), 8,04 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz), 7,27-7,40 (m, 7H), 9,57 (bs, 1H) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 28,5, 29,9, 38,0, 55,7, 70,2, 80,7, 108,5, 113,2, 113,4, 114,3, 115,0, 127,6, 128,1, 128,7, 129,3, 129,4, 130,4, 130,8, 137,3, 147,7, 156,7, 157,8, 158,7, 185,1 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 3330, 3207, 2976, 1681, 1581, 1510, 1496, 1450, 1366, 1343, 1242, 1161, 1074, 1045, 1013, 857, 762, 735, 695 ; HPLC, Tr = 3,38 min ; MS (ESI⁺) : m/z 487,3 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₂₈H₃₁N₄O₄ 487,2346, trouvé 487,2345.

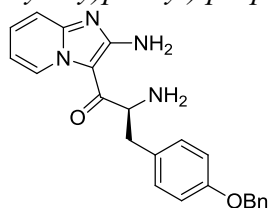
Procédure générale de synthèse des composés 6a à r (dérivés diamines)



A une quantité des composé **5a** à **p** et **5r** (1 éq.), sont ajoutés 5 mL d'une solution aqueuse d'acide hydrochlorique 12N, et le mélange est agité à température ambiante pendant 1h.

Le mélange est neutralisé avec une solution aqueuse d'ammoniaque 35% à froid. La solution est ensuite extraite avec du chloroforme (3x20mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur du sulfate de sodium anhydre, filtrées et le solvant est évaporé sous vide pour donner le dérivé **6**, utilisé tel quel pour l'étape suivante. Les composés **6a** à **p** et **6r** sont isolés avec des rendements de 64% à quantitatif.

Synthèse du composé 6q : (S)-2-amino-1-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-3-(4-(benzyloxy)phényl)propan-1-one.



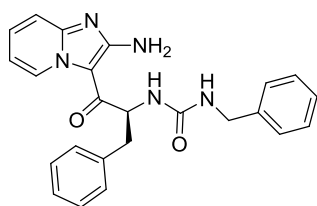
A un équivalent du composé **5q**, est ajouté un mélange de 5mL de TFA/DCM (1:5, v/v). La solution est agitée à température ambiante pendant 1h. A la fin de la réaction, le solvant est éliminé par évaporation sous pression réduite.

Le résidu est solubilisé dans 2mL d'eau et la solution est extraite avec du chloroforme, lavée avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃, séchée sur Na₂SO₄ anhydre, filtrée puis condensée. Le composé diamine **6q** est obtenu sous la forme d'un solide brun, avec un rendement de 86%. Il est employé pour l'étape suivante sans purification supplémentaire.

Solide brun, m = 2,080 g, 86% ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δppm 2,85 (dd, 1H, J = 12,0, 9,0 Hz), 3,19 (dd, 1H, J = 15,0, 3,0 Hz), 3,97 (dd, 1H, J = 9,0, 3,0 Hz), 5,04 (s, 2H), 6,61 (bs, 1H), 6,85 (td, 1H, J = 15,0, 12,0 Hz), 6,95 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,30-7,43 (m, 7H), 9,70 (bs, 1H) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) : δ ppm 38,69, 61,46, 70,25, 109,28, 112,89, 114,14, 115,38 (2C), 127,65 (2C), 128,17, 128,79 (2C), 129,65, 130,36, 130,48, 130,73 (2C), 137,20, 148,25, 157,92, 158,49, 187,26 ; FT-IR : γ_{max} (cm⁻¹) : 3365, 3227, 3089, 2916, 1724, 1625, 1591, 1497, 1462, 1343, 1250, 1236, 1175, 1111, 1038, 1009, 939, 842, 762, 693 ; HPLC, Tr = 2,38 min ; MS (ESI⁺) : m/z 387,3 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₂₃H₂₃N₄O₂ 387,1819, trouvé 387,1821.

Procédure générale de synthèse des dérivés « urée » 7a-l

Synthèse de l'urée non cyclique 9

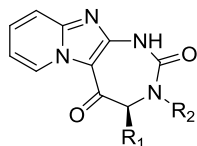


A une solution de 0,050 g de diamine **6a** (0,18 mmol) dans 2 mL d'acétonitrile est ajouté 1 équivalent de 1,1'-carbonyldiimidazole (0,029 g, 0,18 mmol). La solution est agitée à température ambiante pendant 2 heures.

19,5 µL de benzylamine sont ensuite ajoutés (0,0195 g, 0,18 mmol, 1 équivalent) et la solution est maintenue en agitation à température ambiante pour une heure supplémentaire. Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite et le produit brut est purifié par chromatographie sur alumine. Une première élution avec comme système de solvant, un mélange de DCM/EtOH 95/5 v/v permet d'isoler le composé **9** (0,025 g, Rdt = 34%). Une

seconde élution avec le mélange DCM/EtOH 90/10 v/v, permet d'avoir le composé **7a** (0,035 g, Rdt = 64%).

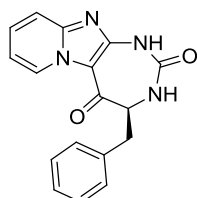
Obtention des urées cycliques 7a-l



A une solution de 1 équivalent de diamine **6** dans 2-5 mL d'acétonitrile, est ajouté 1 équivalent de CDI (1,1'-carbonyldiimidazole). La solution est agitée à température ambiante pendant 2 heures. Le produit précipite dans la solution.

A la fin de la réaction, de l'éther diéthylique est ajouté au milieu réactionnel et le produit est isolé sous la forme d'un précipité après filtration, avec des rendements allant de 40 à 99%.

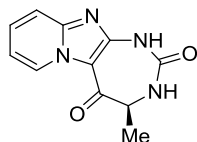
Composé 7a : (S)-4-benzyl-3,4-dihydro-1H-pyrido[1',2':1,2]imidazo[4,5-d][1,3]diazépine-2,5-dione.



Solide blanc, m = 0,850 g, 78%, pf : 280°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = -54,4^\circ$ (c 0,5, DMSO) ; ^1H RMN (DMSO d_6 , 300 MHz) : δ ppm 2,92 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz), 3,10 (m, 1H), 3,93 (m, 1H), 7,28 (m, 6H), 7,39 (m, 1H), 7,66 (m, 2H), 9,40 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz), 10,4 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN (DMSO d_6 , 75 MHz) : δ ppm 34,8, 60,7, 108,2, 114,3, 115,3, 126,4, 128,0, 128,3, 129,2, 131,1, 137,5, 146,1, 151,5, 155,8, 184,0 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3226, 3112, 2976, 2861, 1682, 1652, 1631, 1545, 1488, 1452, 1413, 1343, 1319, 789, 762 ; HPLC, Tr = 1,00 min ; MS (ESI^+) : m/z 307,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2$ 307,1195, trouvé 307,1209.

Composé 7b : (S)-4-méthyl-3,4-dihydro-1H-pyrido[1',2':1,2]imidazo[4,5-d][1,3]diazépine-2,5-dione.

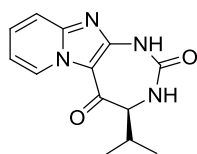


Solide blanc, m = 0,105 g, 93%, pf : 304°C déc. ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +25,0^\circ$ (c 0,5, DMSO) ; ^1H RMN (DMSO d_6 , 400 MHz) : δ ppm 1,32 (d, 3H, $J = 6,9$ Hz), 3,95 (dd, 1H, $J = 6,9, 4,7$ Hz), 7,20 (dd, 1H, $J = 7,7, 6,8$ Hz), 7,41 (bs, 1H), 7,64 (m,

2H), 9,39 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz), 10,33 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN (DMSO d_6 , 100 MHz) : δ ppm 14,6, 53,8, 108,5, 114,2, 115,3, 128,0, 130,9, 145,9, 151,6, 156,6, 184,8 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3114, 2942, 1710, 1650, 1546, 1482, 1448, 1416, 1340, 1319, 1265, 1207, 1085, 912, 898, 842, 760 ; HPLC, Tr = 0,99 min ; MS (ESI^+) : m/z 231,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_2$ 231,0882, trouvé 231,0884.

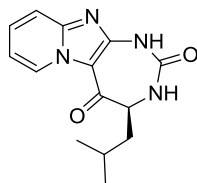
Composé 7c : (S)-4-isopropyl-3,4-dihydro-1H-pyrido[1',2':1,2]imidazo[4,5-d][1,3]diazépine-2,5-dione.



Solide blanc, m = 0,670 g, 60%, pf : 311-313°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -37,0^\circ$ (c 1,0, DMSO) ; ^1H RMN (DMSO d_6 , 400 MHz) : δ ppm 0,80 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz), 1,01 (d, 3H, $J = 6,6$ Hz), 2,04 (m, 1H), 3,12 (m, 1H), 7,19 (m, 1H), 7,65 (m, 3H), 9,44 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz), 10,47 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN (DMSO d_6 , 100 MHz) : δ ppm 19,4, 19,6, 28,3, 66,5, 108,0, 114,3, 115,3, 128,0, 131,0, 146,1, 150,9, 155,8, 184,5 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 2962, 2927, 2873, 1690, 1627, 1546, 1483, 1448, 1423, 1296, 1166, 1138, 1093, 864, 823, 765 ; HPLC, Tr = 1,14 min ; MS (ESI^+) : m/z 259,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 281,1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2$ 259,1195, trouvé 259,1185.

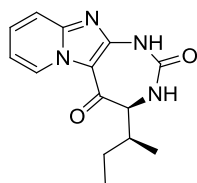
Composé 7d : (S)-4-isobutyl-3,4-dihydro-1H-pyrido[1',2':1,2]imidazo[4,5-d][1,3]diazépine-2,5-dione.



Solide blanc, m = 0,890 g, 86%, pf : 273°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -34,5^\circ$ (c 1,0, DMSO) ; ^1H RMN (DMSO d_6 , 400 MHz) : δ ppm 0,87 (d, 3H, $J = 6,3$ Hz), 0,89 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz), 1,48 (m, 1H), 1,62 (m, 1H), 1,71 (m, 1H), 3,67 (m, 1H), 7,19 (t, 1H, $J = 6,5$ Hz), 7,46 (bs, 1H), 7,63 (m, 2H), 9,40 (d, 1H, $J = 6,5$ Hz), 10,32 (s, 1H) ; ^{13}C RMN (DMSO d_6 , 100 MHz) : δ ppm 21,4, 22,8, 24,2, 38,0, 57,7, 108,2, 114,2, 115,3, 128,1, 131,0, 146,1, 151,3, 156,0, 185,1 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3217, 3117, 2939, 2866, 1682, 1627, 1548, 1485, 1451, 1412, 1312, 1269, 1097, 748 ; HPLC, Tr = 1,19 min ; MS (ESI^+) : m/z 273 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2$ 273,1352, trouvé 273,1338.

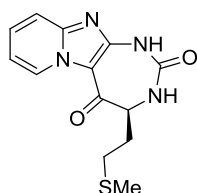
Composé 7e : (S)-4-((S)-sec-butyl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[1',2':1,2]imidazo[4,5-d][1,3]diazépine-2,5-dione.



Solide blanc, m = 0,630 g, 53%, pf : 277°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = -60,3^\circ$ (c 1,0, DMSO) ; ^1H RMN (DMSO d_6 , 300 MHz) : δ ppm 0,74 (d, 3H, $J = 6,6$ Hz), 0,86 (t, 1H, $J = 7,4$ Hz), 1,23 (m, 1H), 1,64 (m, 1H), 1,87 (m, 1H), 3,20 (dd, 1H, $J = 7,4$, 7,1 Hz), 7,19 (t, 1H, $J = 6,5$ Hz), 7,64 (m, 3H), 9,44, (d, 1H, $J = 6,5$ Hz), 10,41 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN (DMSO d_6 , 75 MHz) : δ ppm 10,0, 15,4, 25,0, 33,8, 64,7, 108,0, 114,3, 115,3, 128,0, 131,1, 146,1, 150,8, 155,7, 184,6 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3105, 2963, 2929, 2876, 1685, 1633, 1542, 1488, 1449, 1421, 1340, 1296, 1270, 1217, 1187, 1095, 760, 753 ; HPLC, Tr = 1,16 min ; MS (ESI^+) : m/z 273,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2$ 273,1352, trouvé 273,1338.

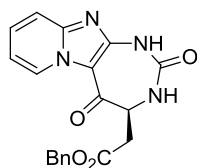
Composé 7f : (S)-4-(2-(méthylthio)ethyl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[1',2':1,2]imidazo[4,5-d][1,3]diazépine-2,5-dione.



Solide blanc, m = 0,074 mg, 68%, pf : 251-253°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = -47,1^\circ$ (c 1,0, DMSO) ; ^1H RMN (DMSO d_6 , 400 MHz) : δ ppm 1,90 (m, 1H), 2,02 (m, 1H), 2,05 (s, 3H), 2,61 (m, 2H), 3,85 (m, 1H), 7,20 (t, 1H, $J = 6,5$ Hz), 7,55 (d, 1H, $J = 5,6$ Hz), 7,65 (m, 2H), 9,39 (d, 1H, $J = 6,5$ Hz), 10,37 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN (DMSO d_6 , 100 MHz) : δ ppm 14,5, 28,3, 29,6, 57,6, 108,5, 114,3, 115,3, 128,1, 131,1, 146,0, 151,5, 156,3, 184,2 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3214, 3101, 3048, 2916, 1680, 1635, 1542, 1486, 1449, 1414, 1338, 1268, 1224, 1143, 1098, 821 ; HPLC, Tr = 1,13 min ; MS (ESI^+) : m/z 291,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ 291,0916, trouvé 291,0927.

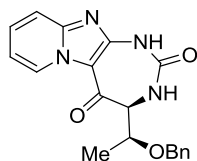
Composé 7g : (S)-benzyl 2-(2,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1H-pyrido[1',2':1,2]imidazo[4,5-d][1,3]diazépin-4-yl)acetate.



Solide blanc, m = 0,048 mg, 62%, pf : 220°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +15,9^\circ$ (c 1,0, DMSO) ; ^1H RMN (DMSO d_6 , 400 MHz) : δ ppm 2,82 (dd, 1H, $J = 16,6, 7,0$ Hz), 2,99 (dd, 1H, $J = 16,6, 6,5$ Hz), 4,32 (dd, 1H, $J = 7,0, 6,5$ Hz), 5,14 (s, 2H), 7,21 (t, 1H, $J = 6,2$ Hz), 7,36 (m, 5H), 7,66 (m, 3H), 9,33 (d, 1H, $J = 6,2$ Hz), 10,39 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN (DMSO d_6 , 100 MHz) : δ ppm 32,9, 54,5, 65,8, 108,6, 114,4, 115,4, 127,8, 128,0, 128,4, 131,2, 136,0, 146,0, 152,1, 156,7, 170,0, 182,4 (un carbone manquant) ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3102, 2875, 2813, 1736, 1348, 1685, 1639, 1550, 1486, 1450, 1417, 1387, 1338, 1270, 1233, 1176, 1138, 911, 890, 863 ; HPLC, Tr = 1,36 min ; MS (ESI^+) : m/z 365 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_4$ 365,1250, trouvé 365,1239.

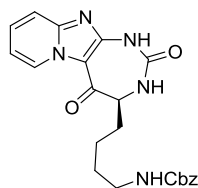
Composé 7h : (S)-4-((S)-1-(benzyloxy)éthyl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[1',2':1,2]imidazo[4,5-d][1,3]diazépine-2,5-dione.



Solide blanc, m = 0,050 mg, 40%, pf : 213°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = -120,9^\circ$ (c 1, DMSO) ; ^1H RMN (DMSO d_6 , 400 MHz) : δ ppm 1,15 (d, 3H, $J = 6,2$ Hz), 3,56 (t, 1H, $J = 7,2$ Hz), 3,91 (m, 1H), 4,36 (d, 1H, $J = 11,6$ Hz), 4,56 (d, 1H, $J = 11,6$ Hz), 7,19 (t, 1H, $J = 6,6$ Hz), 7,22 (m, 5H), 7,43 (dd, 1H, $J = 6,8, 2,3$ Hz), 7,65 (m, 2H), 9,42 (d, 1H, $J = 6,6$ Hz), 10,48 (d, 1H, $J = 2,3$ Hz) ; ^{13}C RMN (DMSO d_6 , 100 MHz) : δ ppm 16,9, 65,5, 70,3, 73,0, 108,9, 114,3, 115,3, 127,3, 127,5, 128,0, 128,2, 131,3, 138,2, 146,3, 151,4, 155,9, 183,0 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3118, 2971, 2928, 1683, 1647, 1628, 1544, 1531, 1485, 1409, 1338, 1297, 1136, 1091, 1066, 1051, 769, 758, 696 ; HPLC, Tr = 1,37 min ; MS (ESI^+) : m/z 351,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_3$ 351,1457, trouvé 351,1440.

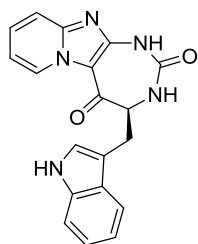
Composé 7i : (S)-benzyl (4-(2,5-dioxo-2,3,4,5-tétrahydro-1H-pyrido[1',2':1,2]imidazo[4,5-d][1,3]diazépin-4-yl)butyl)carbamate.



Solide blanc, m = 0,080 mg, 56 %, pf : 174°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = -15,9^\circ$ (c 1,0, DMSO) ; ^1H RMN (DMSO d_6 , 400 MHz) : δ ppm 1,33 (m, 1H), 1,44 (m, 3H), 1,62 (m, 1H), 1,73 (m, 1H), 3,00 (m, 2H), 3,62 (m, 1H), 4,99 (s, 2H), 7,18 (m, 1H), 7,25 (dd, 1H, $J = 5,8, 6,6$ Hz), 7,33 (m, 5H), 7,47 (d, 1H, $J = 5,8$ Hz), 7,64 (m, 2H), 9,40 (d, 1H, $J = 6,6$ Hz), 10,37 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN (DMSO d_6 , 100 MHz) : δ ppm 22,8, 28,6, 29,0, 59,1, 65,1, 108,3, 114,2, 115,4, 127,7, 128,1, 128,3, 131,0, 137,3, 146,0, 151,4, 156,1, 156,3, 184,8 (deux carbones manquants) ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3099, 2931, 2861, 1682, 1630, 1545, 1531, 1486, 1449, 1412, 1338, 1247, 1097, 770,4 ; HPLC, Tr = 1,38 min ; MS (ESI^+) : m/z 422 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_4$ 422,1828, trouvé 422,1816.

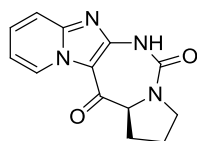
Composé 7j : (S)-4-((1H-indol-3-yl)méthyl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[1',2':1,2]imidazo[4,5-d][1,3]diazépine-2,5-dione.



Solide beige, m = 0,080 g, 89%, pf : >330°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = -8,8^\circ$ (c 0,25, DMSO) ; ^1H RMN (DMSO d_6 , 300 MHz) : δ ppm 3,05 (dd, 1H, $J = 14,8, 9,1$ Hz), 3,20 (dd, 1H, $J = 14,8, 5,0$ Hz), 3,95 (m, 1H), 6,93 (dd, 1H, $J = 6,6, 7,5$ Hz), 7,06 (t, 1H, $J = 7,5$ Hz), 7,20 (m, 2H), 7,39 (m, 3H), 7,67 (m, 2H), 9,40 (d, 1H, $J = 6,6$ Hz), 10,43 (bs, 1H), 10,92 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN (DMSO d_6 , 100 MHz) : δ ppm 25,2, 60,0, 108,2, 109,4, 111,4, 114,2, 115,3, 117,9, 118,4, 121,0, 124,1, 127,0, 128,1, 131,0, 136,2, 146,1, 151,4, 155,9, 184,6 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3126, 2920, 1685, 1626, 1551, 1484, 1453, 1411, 1340, 740, 1092, 1064, 906 ; HPLC, Tr = 1,49 min ; MS (ESI^+) : m/z 346 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_2$ 346,1304, trouvé 346,1308.

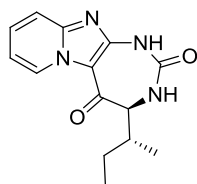
Composé 7k : (S)-2,3-dihydro-1H-pyrido[2',1':2,3]imidazo[4,5-f]pyrrolo[1,2-c][1,3]diazépine-5,13(6H,13aH)-dione.



Solide beige, m = 0,115 g, 99%, pf : 178-180°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = -8,2^\circ$ (c 0,5, DMSO) ; ^1H RMN (DMSO d_6 , 300 MHz) : δ ppm 1,91 (m, 3H), 3,33 (m, 1H), 3,79 (m, 2H), 5,31 (m, 1H), 6,59 (bs, 1H), 6,96 (t, 1H, $J = 6,5$ Hz), 7,35 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,50 (dd, 1H, $J = 6,5, 8,0$ Hz), 8,21 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN (DMSO d_6 , 75 MHz) : δ ppm 24,7, 28,7, 49,7, 63,6, 112,6, 113,5, 118,2, 128,7, 128,8, 130,6, 137,0, 157,7, 183,9 ; FT-IR : γ_{\max} (cm^{-1}) : 3410, 3315, 3143, 1682, 1607, 1494, 1416, 1349, 1266, 1226, 1056, 1035, 1012, 759, 749 ; HPLC, Tr = 0,78 min ; MS (ESI^+) : m/z 257,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_2$ 257,1039, trouvé 257,1032.

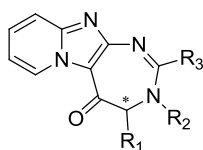
Composé 7l : (S)-4-((R)-sec-butyl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[1',2':1,2]imidazo[4,5-d][1,3]diazépine-2,5-dione.



Solide blanc, m = 0,082 g, 60%, pf : 277°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +53,6^\circ$ (c 1,0, DMSO) ; ^1H RMN (DMSO d_6 , 300 MHz) : δ ppm 0,74 (d, 3H, $J = 6,6$ Hz), 0,86 (t, 1H, $J = 7,4$ Hz), 1,23 (m, 1H), 1,64 (m, 1H), 1,87 (m, 1H), 3,20 (dd, 1H, $J = 7,1, 7,4$ Hz), 7,19 (t, 1H, $J = 6,5$ Hz), 7,64 (m, 3H), 9,44 (d, 1H, $J = 6,5$ Hz), 10,41 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN (DMSO d_6 , 75 MHz) : δ ppm 10,0, 15,4, 25,0, 33,8, 64,7, 108,0, 114,3, 115,3, 128,0, 131,1, 146,1, 150,8, 155,7, 184,6 ; FT-IR : γ_{\max} (cm^{-1}) : 3105, 2963, 2929, 2876, 1685, 1633, 1542, 1488, 1449, 1421, 1340, 1296, 1270, 1217, 1187, 1095, 760, 753 ; HPLC, Tr = 1,16 min ; MS (ESI^+) : m/z 273,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2$ 273,1352, trouvé 273,1338.

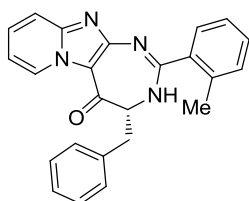
Procédure générale de synthèse des composés IP-diazépin-5-ones 10 et 11a-k, 13a-b, 13d-g et 17



A un équivalent de composé diamine **6**, dissous dans 6 mL de chloroforme, est ajouté un équivalent d'aldéhyde. Le mélange est agité à 60°C entre 6h et une nuit.

L'évolution de la réaction est suivie par CCM (plaque d'alumine, éluant : DCM/EtOH, 99:1, v/v). Lorsque la cyclisation est terminée (absence de la diamine de départ en CCM et LC), le milieu réactionnel est ramené à température ambiante. Une solution de 1,1 équivalent de diiode dissous dans 4 mL de chloroforme et une solution de 1,1 équivalent de tétraacétate de plomb dans 6 mL de chloroforme sont ajoutées au milieu réactionnel et le mélange est agité pendant 6h à température ambiante. Le suivi réactionnel est réalisé par CCM (mêmes conditions que précédemment). A la fin de la réaction, la solution est lavée avec une solution aqueuse de thiosulfate de sodium à 10% (3x30 mL), puis avec une solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et condensée sous pression réduite. Le brut réactionnel est ensuite purifié sur colonne d'alumine (éluant : DCM puis DCM/EtOH 99:1, v/v) pour donner les composés **10**, **11a-k**, **13a-b**, **13d-g** et **17** avec des rendements de 22 à 97%.

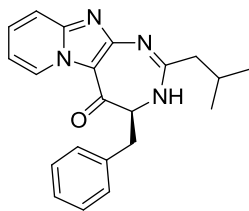
Composé 10 : (4R)-4-benzyl-2-(2-méthylphényl)-3,4-dihydro-5H-pyrido[1',2':1,2]imidazo-[4,5-d][1,3]diazépin-5-one.



Solide jaune, m = 0,117 g, 38%, pf : 135,5-136,5°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +9,1^\circ$ (c 1,0, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 2,16 (s, 3H), 3,30 (dd, 1H, J = 13,6, 9,4 Hz), 3,56 (dd, 1H, J = 13,6, 9,2 Hz), 4,11 (dd, 1H, J = 9,4, 9,2 Hz), 5,66 (d, 1H, J = 9,2 Hz), 6,84 (t, 1H, J = 6,6 Hz), 7,02-7,33 (m, 11H), 9,39 (d, 1H, J = 6,6 Hz) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 20,3, 37,0, 69,7, 113,6, 114,8, 126,1, 128,3, 129,4, 130,0, 130,1, 130,7, 131,2, 131,5, 135,8, 138,4, 140,0, 145,3, 152,7, 155,4, 181,5 ; FT-IR : γ_{max} (cm⁻¹) : 2920, 1625, 1523, 1462, 1422, 1335, 1250, 767, 696 ; HPLC, Tr = 1,33 min ; MS (ESI⁺) : m/z 381,0 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₂₄H₂₁N₄O 381,1715, trouvé 381,1710.

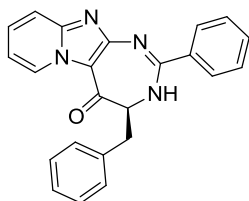
Composé 11a : (4S)-4-benzyl-2-isobutyl-3,4-dihydro-5H-pyrido[1',2':1,2]imidazo[4,5-d][1,3]diazépin-5-one.



Solide jaune pale, m = 0,014 g, 22%, pf : 173-176°C (déc) ;
Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = -23,0^\circ$ (c 1,0, DMSO) ; ^1H RMN (DMSO d_6 , 300 MHz) : δ ppm 0,79 (d, 6H, $J = 6,6$ Hz), 1,12 (dd, 1H, $J = 18,4, 6,6$ Hz), 1,98 (m, 1H), 2,24 (m, 2H), 2,88 (m, 1H), 3,17 (m, 1H), 3,89 (dd, 1H, $J = 8,5, 4,5$ Hz), 7,12-7,27 (m, 8H), 7,61 (m, 2H), 9,35 (d, 1H, $J = 6,9$ Hz) ; ^{13}C RMN (DMSO d_6 , 75 MHz) : δ ppm 22,0, 22,1, 26,9, 29,0, 36,1, 113,5, 115,4, 116,5, 126,1, 127,6, 128,1, 128,3, 129,2, 129,3, 130,4, 130,8, 131,6, 181,0 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 2953, 2918, 2285, 1625, 1567, 1479, 1414, 1337, 1324, 760, 698 ; HPLC, Tr = 1,26 min ; MS (ESI^+) : m/z 347,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}$ 347,1872, trouvé 347,1873.

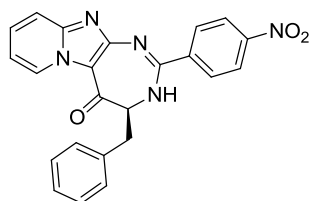
Composé 11b : (4S)-4-benzyl-2-phényl-3,4-dihydro-5H-pyrido[1',2':1,2]imidazo[4,5-d][1,3]diazépin-5-one.



Solide jaune, m = 0,035 g, 53%, pf : 111-112°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +16,8^\circ$ (c 0,89, CHCl_3) ; ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) : δ ppm 3,14 (m, 1H), 3,43 (m, 1H), 4,24 (dd, 1H, $J = 10,5, 4,2$ Hz), 6,96 (t, 1H, $J = 7,0$ Hz), 7,24-7,44 (m, 12H), 7,60 (m, 2H), 9,52 (d, 1H, $J = 7,0$ Hz) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) : δ ppm 36,5, 113,7, 115,9, 126,8, 128,5, 128,6, 128,8, 129,3, 130,3, 131,7, 135,2, 146,2, 182,2 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 2926, 1624, 1525, 1467, 1421, 1335, 1252, 742, 698 ; HPLC, Tr = 1,22 min ; MS (ESI^+) : m/z 368,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}$ 367,1548, trouvé 367,1559.

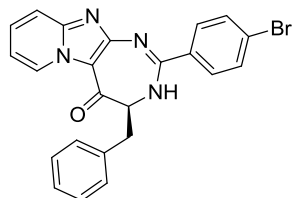
Composé 11c : (4S)-4-benzyl-2-(4-nitrophényl)-3,4-dihydro-5H-pyrido[1',2':1,2]imidazo[4,5-d][1,3]diazépin-5-one.



Solide jaune, m = 0,057 g, 77%, pf : 169-171°C (dec) ;
Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +27,4^\circ$ (c 0,92, DMSO) ; Deux conformères sont détectés en ^1H RMN dans le DMSO ; ^1H RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz) : δ ppm 2,71 (dd, 0,6H, $J = 15,1, 3,6$ Hz), 3,00 (dd, 1H, $J = 13,9, 4,7$ Hz), 3,20 (dd, 0,6H, $J = 13,5, 13,3$ Hz), 3,45 (dd, 1H, $J = 13,5, 13,3$ Hz), 4,13 (dd, 0,6H, $J = 9,3, 4,7$ Hz), 4,27 (m, 1H), 7,20 (m, 5H), 7,28 (m, 3H), 7,32 (d, 1H, $J = 7,3$ Hz), 7,38 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz), 7,71 (m, 3H), 7,82 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz), 7,96 (d, 1,2H, $J = 7,6$ Hz), 8,25 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz), 8,29 (d, 1,2H, $J = 8,3$ Hz), 8,82 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz), 9,38 (d, 0,6H, $J = 6,6$ Hz), 9,50 (d, 1H, $J = 6,4$ Hz), 11,5 (s, 0,6H) ; ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 75 MHz) : δ ppm 35,4, 62,9, 114,1, 116,2, 123,2, 126,8, 127,7, 127,8, 128,0, 128,5, 129,4, 129,7, 130,2, 130,7, 136,6, 146,5, 149,1, 155,2, 182,2 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 2921, 2851, 1626, 1519, 1467, 1421, 1337, 849, 760, 697 ; HPLC, Tr = 1,51 min ; MS (ESI^+) : m/z 412,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_3$ 412,1410, trouvé 412,1411.

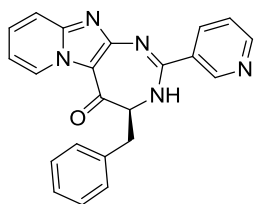
Composé 11d : (4S)-4-benzyl-2-(4-bromophényl)-3,4-dihydro-5H-pyrido[1',2':1,2]-imidazo[4,5-d][1,3]diazépin-5-one.



Solide beige, m = 0,065 g, 82%, pf : 102-107°C (dec) ;
Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +1,0^\circ$ (c 1,0, CHCl_3) ; ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) : δ ppm 3,06 (m, 1H), 3,40 (m, 1H), 4,27 (dd, 1H, $J = 11,1, 4,1$ Hz), 7,06 (m, 1H), 7,28-7,45 (m, 9H), 7,53 (m, 1H), 7,72 (m, 1H) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) : δ ppm 36,4, 63,2, 114,0, 116,3, 126,7, 127,0, 127,1, 127,2, 128,7, 129,0, 129,8, 130,5, 130,6, 130,7, 131,8, 134,2, 182,2 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 2927, 1625, 1580, 1554, 1479, 1423, 1337, 1071, 1009, 765, 699 ; HPLC, Tr = 1,33 min ; MS (ESI^+) : m/z 445,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 447,0 $[\text{M}+2+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{BrN}_4\text{O}$ 445,0664, trouvé 445,0665.

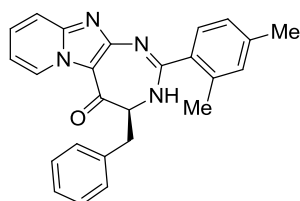
Composé 11e : (4S)-4-benzyl-2-(3-pyridinyl)-3,4-dihydro-5H-pyrido[1',2':1,2]imidazo[4,5-d][1,3]diazépin-5-one.



Solide jaune pâle, m = 0,055 g, 77%, pf : 87-89°C ;
Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +10,9^\circ$ (c 1,0, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 2,85 (m, 1H), 3,19-3,36 (m, 1H), 4,27 (m, 1H), 6,98 (t, 1H, *J* = 6,9 Hz), 7,17-7,25 (m, 7H), 7,55 (m, 2H), 8,00 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz), 8,55 (d, 1H, *J* = 2,8 Hz), 9,51 (d, 1H, *J* = 6,9 Hz) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 36,2, 63,9, 114,0, 116,8, 123,3, 127,6, 128,6, 129,2, 129,6, 129,7, 130,5, 131,1, 131,4, 137,1, 149,6, 150,3, 152,2, 156,1, 157,9, 182,6 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 2923, 1622, 1584, 1558, 1472, 1427, 1412, 1337, 1254, 1202, 1078, 1025, 919, 744, 700 ; HPLC, Tr = 1,07 min ; MS (ESI⁺) : m/z 368,0 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₂₂H₁₈N₅O 368,1511, trouvé 368,1515.

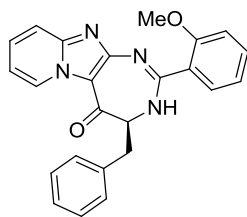
Composé 11f : (4S)-4-benzyl-2-(2,4-diméthylphényl)-3,4-dihydro-5H-pyrido[1',2':1,2]-imidazo[4,5-d][1,3]diazépin-5-one.



Solide jaune, m = 0,080 g, 38% ; pf : 107,0-108,0°C ;
Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = -20,2^\circ$ (c 1, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 2,12 (s, 3H), 2,21 (s, 3H), 3,25 (dd, 1H, *J* = 9,0, *J* = 12,0 Hz), 3,51 (dd, 1H, *J* = 12,0, 6,0 Hz), 4,20 (bs, 1H), 5,93 (bs, 1H), 6,89 (m, 3H), 7,19 (m, 8H), 9,40 (d, 1H, *J* = 6,0 Hz) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 20,4, 21,4, 36,9, 60,5, 111,9, 113,9, 115,2, 126,5, 126,8, 128,4, 128,5, 129,9, 130,1, 131,6, 132,0, 138,5, 141,5, 145,4, 152,6, 152,7, 156,8, 159,2, 181,6 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 3027, 2956, 2923, 1732, 1645, 1633, 1556, 1523, 1480, 1421, 1335, 1299, 1247, 1122, 1094, 1073, 1044, 949, 898, 820, 761 ; HPLC, Tr = 1,60 min ; MS (ESI⁺) : m/z 395,1 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₂₅H₂₃N₄O 395,1872, trouvé 395,1858.

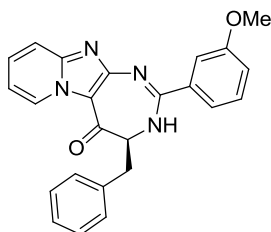
Composé 11g : (4S)-4-benzyl-2-(2-méthoxyphényl)-3,4-dihydro-5H-pyrido[1',2':1,2]-imidazo[4,5-d][1,3]diazépin-5-one.



Solide jaune, m = 0,255 g, 72% ; pf : 104,0-105,0°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = -24,86^\circ$ (c 1,5, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 3,09 (m, 1H), 3,32 (m, 1H), 3,60 (s, 3H), 4,24 (dd, 1H, $J = 9,0, 6,0$ Hz), 6,80 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz), 6,99 (m, 2H), 7,20-7,24 (m, 6H), 7,35-7,46 (m, 3H), 8,22 (bs, 1H), 9,50 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 36,5, 56,0, 66,4, 111,6, 112,6, 113,8, 116,0, 121,5, 122,3, 126,7, 128,6, 128,7, 129,8, 129,9, 130,6, 133,1, 133,3, 138,1, 146,5, 156,3, 158,1, 181,9 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 2971, 1645, 1622, 1601, 1562, 1524, 1481, 1453, 1335, 1297, 1269, 1240, 1182, 1163, 1126, 1106, 1073, 1042, 1024, 978, 921, 904, 842, 722, 741, 680, 660, 694 ; HPLC, Tr = 1,34 min ; MS (ESI⁺) : m/z 397,1 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₂₄H₂₁N₄O₂ 397,1665, trouvé 397,1655.

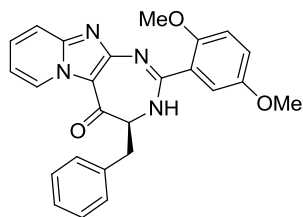
Composé 11h : (4S)-4-benzyl-2-(3-méthoxyphényl)-3,4-dihydro-5H-pyrido[1',2':1,2]-imidazo[4,5-d][1,3]diazépin-5-one.



Gomme marron, m = 0,130 g, 94% ; pf : 66,0-67,0°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +3,2^\circ$ (c 0,375, DMSO) ; ¹H RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) : δ ppm 2,96 (dd, 1H, $J = 12,0, 8,0$ Hz), 3,26 (dd, 1H, $J = 12,0, 4,0$ Hz), 3,75 (s, 3H), 4,56 (dd, 1H, $J = 12,0, 4,0$ Hz), 6,97-7,03 (m, 1H), 7,13-7,50 (m, 10H), 7,90-7,97 (m, 2H), 9,54 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz) ; ¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 100 MHz) : δ ppm 34,7, 55,4, 63,7, 111,7, 114,8, 115,1, 116,4, 120,2, 122,7, 127,0, 128,5, 128,6, 129,4, 129,8, 133,4, 136,1, 143,4, 150,1, 158,0, 158,3, 159,0, 180,3 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 2963, 1648, 1596, 1580, 1519, 1488, 1466, 1454, 1417, 1332, 1292, 1259, 1177, 1129, 1029, 762 ; HPLC, Tr = 1,42 min ; MS (ESI⁺) : m/z 397,1 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₂₄H₂₁N₄O₂ 397,1665, trouvé 397,1654.

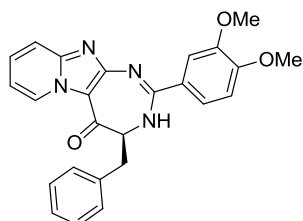
Composé 11i : (4S)-4-benzyl-2-(2,5-diméthoxyphényl)-3,4-dihydro-5H-pyrido[1',2':1,2]-imidazo[4,5-d][1,3]diazépin-5-one.



Solide jaune, m = 0,089 g, 97% ; pf : 155,0-156,0°C ;
Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = -12,0^\circ$ (c 1,0, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 3,13 (m, 1H), 3,31 (m, 1H), 3,59 (s, 3H), 3,79 (s, 3H), 4,25 (m, 1H), 6,76 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz), 6,92-7,03 (m, 2H), 7,16-7,24 (m, 6H), 7,47 (t, 2H, $J = 6,0$ Hz), 7,80 (bs, 1H), 9,54 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 36,5, 56,2, 56,7, 112,6, 113,4, 113,9, 116,0, 120,3, 126,5, 126,7, 128,6, 128,7, 129,8, 129,9, 130,7, 134,2, 138,0, 143,2, 146,4, 152,5, 154,1, 182,0 (1C manquant) ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 3019, 2928, 2832, 1647, 1635, 1565, 1526, 1480, 1460, 1448, 1412, 1335, 1318, 1268, 1240, 1220, 1178, 1099, 1074, 1042, 1024, 961, 941, 902, 870, 813, 755, 740, 697, 676 ; HPLC, Tr = 1,66 min ; MS (ESI⁺) : m/z 427,1 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₂₅H₂₃N₄O₃ 427,1770, trouvé 427,1778.

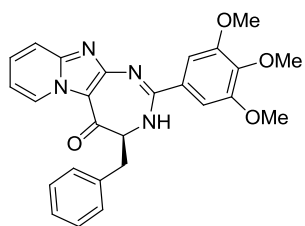
Composé 11j : (4S)-4-benzyl-2-(3,4-diméthoxyphényl)-3,4-dihydro-5H-pyrido[1',2':1,2]-imidazo[4,5-d][1,3]diazépin-5-one.



Solide jaune, m = 0,115 g, 77% ; pf : 136,0-137,0°C ;
Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +36,8^\circ$ (c 1,0, DMSO) ; ¹H RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) : δ ppm 2,81 (bs, 1H), 3,06 (bs, 1H), 3,70 (s, 3H), 3,81 (s, 3H), 4,15 (bs, 1H), 6,97 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,14 (bs, 1H), 7,17 (td, 1H, $J = 8,0, 4,0$ Hz), 7,24-7,32 (m, 6H), 7,64-7,70 (m, 2H), 9,47 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz) (1H manquant) ; ¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 100 MHz) : δ ppm 35,1, 54,9, 55,4, 55,6, 108,4, 110,8, 112,3, 113,6, 115,7, 122,6, 125,3, 126,5, 127,3, 127,8, 128,3, 129,5, 129,7, 130,5, 136,7, 146,1, 147,9, 151,8, 180,1 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 2925, 2853, 1623, 1599, 1557, 1510, 1496, 1462, 1435, 1335, 1261, 1231, 1173, 1140, 1080, 1021, 973, 937, 840, 814, 699, 764, 739 ; HPLC, Tr = 1,33 min ; MS (ESI⁺) : m/z 427,0 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₂₅H₂₃N₄O₃ 427,1770, trouvé 427,1774.

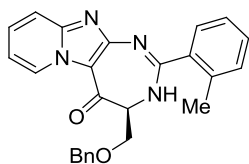
Composé 11k : (4S)-4-benzyl-2-(3,4,5-triméthoxyphényl)-3,4-dihydro-5H-pyrido[1',2':1,2]-imidazo[4,5-d][1,3]diazépin-5-one.



Solide jaune, m = 0,192 g, 59% ; pf : 119,0-120,0°C ;
Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +22,98^\circ$ (c 0,87, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 3,35 (bs, 1H), 3,70 (s, 6H), 3,82 (s, 4H), 4,31 (bs, 1H), 6,82 (bs, 2H), 7,03 (td, 1H, $J = 14,5, 6,9$ Hz), 7,33 (m, 8H), 9,58 (bs, 1H) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) : δ ppm 29,9, 36,5, 56,4, 61,0, 105,1, 106,8, 112,1, 114,2, 115,9, 127,1, 128,8, 128,9, 129,9, 130,9, 141,7, 146,2, 153,1, 166,5, 182,3 (1C manquant) ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 2937, 2836, 1719, 1625, 1559, 1462, 1409, 1333, 1232, 1122, 1000, 763, 700 ; HPLC, Tr = 1,50 min ; MS (ESI⁺) : m/z 457,1 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₂₅H₂₅N₄O₄ 457,1876, trouvé 457,1874.

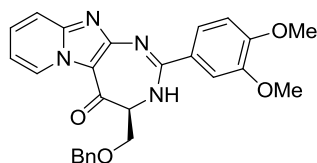
Composé 13a : (4S)-4-benzyloxyméthyl-2-(2-méthylphényl)-3,4-dihydro-5H-pyrido[1',2':1,2]-imidazo[4,5-d][1,3]diazépin-5-one.



Solide jaune, m = 0,036 g, 31% ; pf : 102,0-103,0°C ;
Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = -8,25^\circ$ (c 0,4, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 2,41 (bs, 3H), 4,10 (bs, 1H), 4,25 (dd, 1H, $J = 9,0, 6,0$ Hz), 4,54 (m, 1H), 4,71 (bs, 2H), 6,93 (t, 1H, $J = 6,0$ Hz), 7,17 (dd, 3H, $J = 9,0, 6,0$ Hz), 7,29-7,39 (m, 8H), 7,63 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz), 9,47 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) : δ ppm 29,8, 69,9, 73,7, 73,8, 113,8, 115,3, 126,0, 126,1, 126,2, 127,8, 128,0, 128,5, 128,6, 130,4, 130,8, 130,9, 131,2, 131,3, 135,6, 138,3, 138,4, 145,7, 180,6 ; HPLC, Tr = 1,55 min ; MS (ESI⁺) : m/z 411,3 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₂₅H₂₃N₄O₂ 411,1821, trouvé 411,1825.

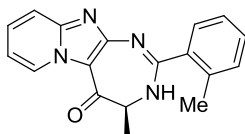
Composé 13b : (4S)-4-benzyloxyméthyl-2-(3,4-diméthoxyphényl)-3,4-dihydro-5H-pyrido[1',2':1,2]imidazo[4,5-d][1,3]diazépin-5-one.



Solide jaune, m = 0,069 g, 47% ; pf : 80,5-81,5°C ;
Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = -27,0^\circ$ (c 0,8, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 3,82 (s, 3H), 3,89 (bs, 5H), 4,26 (bs, 1H), 4,60 (bs, 2H), 6,79 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz), 6,98 (t, 1H, $J = 6,0$ Hz), 7,30-7,52 (m, 8H), 7,66 (bs, 2H), 9,53 (bs, 1H) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) : δ ppm 55,8 (2C), 60,6, 67,1, 73,5, 110,2, 111,7, 113,5, 116,5, 121,9, 122,9, 127,9, 128,4, 130,1, 137,0, 142,5, 147,1, 148,9, 150,8, 152,3, 158,5, 159,0, 160,7, 181,1 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 3216, 2931, 2853, 1622, 1559, 1508, 1462, 1427, 1334, 1233, 1132, 1094, 1020, 764, 738, 697 ; HPLC, Tr = 1,54 min ; MS (ESI⁺) : m/z 457,3 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₂₆H₂₅N₄O₄ 457,1876, trouvé 457,1873.

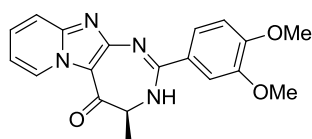
Composé 13d : (4S)-4-méthyl-2-(2-méthylphényl)-3,4-dihydro-5H-pyrido[1',2':1,2]-imidazo[4,5-d][1,3]diazépin-5-one.



Solide blanc, m = 0,023 g, 8% ; pf : 124,0°C-125,0°C ;
Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = -41,04^\circ$ (c 0,57, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) : δ ppm 1,68 (bs, 3H), 2,42 (s, 3H), 4,09-4,16 (m, 1H), 6,93 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,17-7,35 (m, 6H), 7,61 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 9,48 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) : δ ppm 16,6, 20,3, 29,6, 63,4, 111,7, 113,4, 114,8, 126,0, 128,2, 130,0, 130,5, 131,0, 131,1, 135,6, 137,9, 145,4, 154,6, 182,5 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 2929, 1645, 1627, 1558, 1523, 1482, 1419, 1337, 1300, 1248, 757 ; HPLC, Tr = 1,14 min ; MS (ESI⁺) : m/z 305,3 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₁₈H₁₇N₄O 305,1402, trouvé 305,1404.

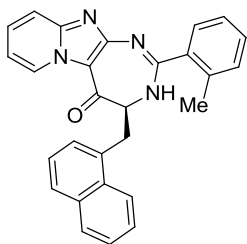
Composé 13e : (4S)-4-méthyl-2-(3,4-diméthoxyphényl)-3,4-dihydro-5H-pyrido[1',2':1,2]-imidazo[4,5-d][1,3]diazépin-5-one.



Solide blanc, m = 0,006 g, 6% ; pf : 102,0-103,0°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = -40,8^\circ$ (*c* 0,25, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 1,61 (bs, 3H), 3,90 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 4,66 (bs, 1H), 6,84 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz), 6,97 (t, 1H, *J* = 9,0 Hz), 7,45-7,48 (m, 3H), 7,67 (bs, 1H), 8,07 (bs, 1H), 9,53 (d, 1H, *J* = 6,0 Hz) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 16,4, 56,1, 56,2, 56,3, 109,7, 110,6, 112,3, 113,7, 116,1, 117,6, 121,5, 128,0, 128,6, 129,9, 130,2, 149,3, 152,5, 183,1 (1C manquant) ; HPLC, Tr = 1,10 min ; MS (ESI⁺) : *m/z* 351,2 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₁₉H₁₉N₄O₃ 351,1457, trouvé 351,1458.

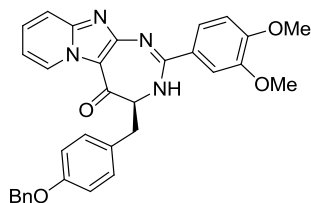
Composé 13f : (4*S*)-4-(1-naphthyl)méthyl-2-(2-méthylphényl)-3,4-dihydro-5*H*-pyrido-[1',2':1,2]imidazo[4,5-*d*][1,3]diazépin-5-one.



Solide jaune, *m* = 0,105 g, 45% ; pf : 134,4-135,4°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +29,4^\circ$ (*c* 0,5, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 2,20 (s, 3H), 3,71 (bs, 1H), 4,18 (bs, 2H), 6,9 (t, 1H, *J* = 9,0 Hz), 7,12-7,19 (m, 4H), 7,30-7,48 (m, 5H), 7,61 (bs, 1H), 7,76 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz), 7,85 (dd, 2H, *J* = 9,0, 3,0 Hz), 8,05 (dd, 1H, *J* = 9,0, 3,0 Hz), 9,48 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 20,4, 33,9, 113,7, 115,3, 120,2, 121,8, 124,0, 125,6, 126,0 (2C), 127,3, 128,4, 128,6, 128,9, 130,3, 130,7, 131,2, 132,3 (2C), 134,1, 135,6, 138,4, 145,6, 156,1, 157,4, 159,5, 181,6 (1C manquant) ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 2927, 1691, 1632, 1556, 1523, 1480, 1421, 1335, 1301, 1247, 1162, 1124, 760 ; HPLC, Tr = 1,69 min ; MS (ESI⁺) : *m/z* 431,2 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₂₈H₂₃N₄O 431,1872, trouvé 431,1873.

Composé 13g : (4*S*)-4-(4-benzyloxy)benzyl-2-(3,4-diméthoxyphényl)-3,4-dihydro-5*H*-pyrido-[1',2':1,2]imidazo[4,5-*d*][1,3]diazépin-5-one.

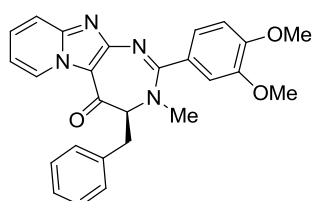


Solide orange, *m* = 0,134 g, 65% ; pf : 129,0-130,0°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +3,93^\circ$ (*c* 1,5, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 3,71-3,78 (bs, 4H), 3,81-3,88 (bs, 4H), 4,18 (bs, 1H), 5,02 (s, 2H), 6,64 (d, 1H, *J* = 6,0 Hz), 6,90 (d, 2H, *J* = 9,0

Hz), 6,98 (t, 1H, $J = 6,0$ Hz), 7,19-7,45 (m, 12H), 9,53 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) : δ ppm 30,2, 31,4, 35,8, 56,5, 70,6, 110,8, 112,8, 113,1, 113,2, 114,4, 115,4, 115,6, 116,5, 123,0, 127,4, 127,9, 128,5, 129,1, 130,2, 131,0, 131,2, 132,5, 137,4, 146,7, 149,4, 153,1, 153,8, 158,4, 183,0 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3031, 2932, 2837, 1730, 1624, 1557, 1510, 1461, 1425, 1335, 1260, 1231, 1140, 1020, 811, 764, 736, 695 ; HPLC, Tr = 3,08 min ; MS (ESI^+) : m/z 533,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{32}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_4$ 533,2194, trouvé 533,2189.

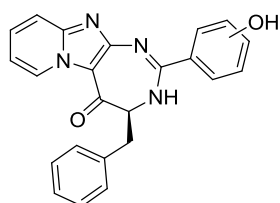
Composé 16 : (S)-4-benzyl-2-(3,4-diméthoxyphényl)-3-méthyl-3H-pyrido[1',2':1,2]-imidazo[4,5-d][1,3]diazépin-5(4H)-one.



Solide jaune, $m = 0,120$ g, 54% ; pf : 217,0-218,0°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +174,1^\circ$ (c 0,39, CHCl_3) ; ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) : δ ppm 2,69 (bs, 1H), 2,73 (bs, 1H), 2,98 (s, 3H), 3,71 (s, 3H), 3,86 (s, 3H), 4,32 (bs, 1H), 6,67 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 6,85 (s, 2H), 6,98 (td, 1H, $J = 6,9, 5,7$ Hz), 7,28 (bs, 5H), 7,50 (td, 1H, $J = 14,6, 7,1$ Hz), 7,69 (d, 1H, $J = 8,9$ Hz), 9,55 (d, 1H $J = 6,9$ Hz) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) : δ ppm 29,9, 34,3, 45,6, 56,2, 72,4, 110,3, 112,8, 113,7, 113,9, 116,9, 125,4, 127,4, 128,4, 128,6, 129,0, 129,6, 130,4, 136,7, 147,4, 148,5, 151,95, 158,5, 160,7, 183,0 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3055, 3000, 2928, 2837, 1624, 1543, 1515, 1478, 1455, 1436, 1359, 1340, 1262, 1126, 1019, 879, 817, 757, 706 ; HPLC, Tr = 2,45 min ; MS (ESI^+) : m/z 441,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_3$ 441,1931, trouvé 429,1927.

Procédure générale de synthèse des dérivés phénoliques 12a-d

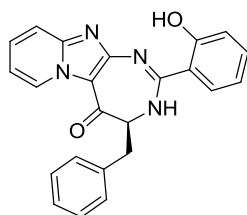


A une solution 0,1g de composé **11g-i**, **11k** dans 10 mL de dichlorométhane, refroidie à 0°C, est ajoutée une solution de tribromure de bore 1M dans le DCM (six équivalents). Le mélange est agité à TA pendant 3h (suivi réactionnel réalisé

par CCM). La réaction est arrêtée par addition d'eau distillée (30 mL). Dans le cas des composés **12a-c**, la solution est extraite avec de l'acétate d'éthyle et la phase organique est

séchée sur sulfate anhydre de sodium. Le solvant est éliminé sous pression réduite et le résidu est solubilisé dans l'acétate d'éthyle. Les produits **12a-c** sont isolés avec des rendements de 45 à 81%, après précipitation et lavage avec l'éther d'éthylique. Dans le cas du composé **12d**, une extraction continue est réalisée et le produit est isolé avec un rendement de 24%.

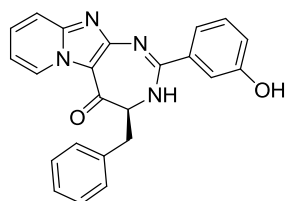
Composé 12a : (4S)-4-benzyl-2-(2-hydroxyphényl)-3,4-dihydro-5H-pyrido[1',2':1,2]imidazo-[4,5-d][1,3]diazépin-5-one.



Solide marron, m = 0,117 g, 81% ; pf : 187,0-188,0°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +35,2^\circ$ (c 0,25, DMSO) ; ^1H RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz) : δ ppm 2,90 (m, 1H), 3,15 (m, 1H), 4,41 (m, 1H), 6,70 (m, 1H), 6,86 (m, 1H), 7,17 (m, 9H), 7,35 (m, 1H), 7,80 (bs, 2H), 9,47 (m, 1H) ; ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 75 MHz) : δ ppm 35,0, 64,0, 112,1, 114,8, 114,9, 116,1, 117,6, 118,2, 126,8, 128,0, 128,4, 129,4, 131,6, 134,7, 136,5, 145,8, 150,1, 152,8, 159,1, 160,9, 181,2 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3034, 2924, 1724, 1636, 1611, 1583, 1515, 1488, 1454, 1424, 1340, 1310, 1257, 1152, 1117, 1080, 1031, 749;HPLC, Tr = 1,56 min ; MS (ESI^+) : m/z 383,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_2$ 383,1502, trouvé 383,1511.

Composé 12b : (4S)-4-benzyl-2-(3-hydroxyphényl)-3,4-dihydro-5H-pyrido[1',2':1,2]imidazo-[4,5-d][1,3]diazépin-5-one.

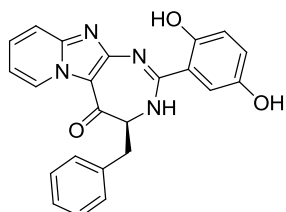


Solide jaune, m = 0,030 g, 45% ; pf : 145,0-146,0°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = -5,0^\circ$ (c 1,0, MeOH) ; ^1H RMN (CD_3OD , 300 MHz) : δ ppm 3,03 (dd, 1H, $J = 12,0, 9,0$ Hz), 3,37 (dd, 1H, $J = 12,0, 6,0$ Hz), 4,68 (dd, 1H, $J = 12,0, 6,0$ Hz), 6,83 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz), 6,98 (bs, 1H), 7,15 (dd, 2H, $J = 9,0, 6,0$ Hz), 7,29-7,38 (m, 7H), 7,43 (t, 1H, $J = 6,0$ Hz), 7,85-7,96 (m, 2H), 9,66 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz) ; ^{13}C RMN (CD_3OD , 75 MHz) : δ ppm 36,9, 66,2, 116,4, 117,7, 118,2, 122,5, 123,1, 128,8, 129,6, 129,9, 130,2, 130,3, 130,7, 131,4, 131,8, 132,1, 134,8, 136,7, 159,5, 163,7, 181,4 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 2930, 1779, 1650,

1594, 1530, 1450, 1420, 1331, 1296, 1264, 1244, 1197, 1126, 1080, 1033, 795; HPLC, Tr = 1,32 min ; MS (ESI⁺) : m/z 383,1 [M+H]⁺; HRMS calculé pour C₂₃H₁₉N₄O₂ 383,1508, trouvé 383,1495.

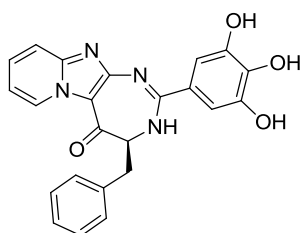
Composé 12c : (4S)-4-benzyl-2-(2,5-dihydroxyphényl)-3,4-dihydro-5H-pyrido[1',2':1,2]-imidazo-[4,5-d][1,3]diazépin-5-one.



Solide jaune, m = 0,037 g, 79% ; pf : 260,5-261,5°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +81,48^\circ$ (c 0,405, DMSO) ; ¹H RMN (DMSO-*d*₆, 300 MHz) : δ ppm 2,82 (dd, 1H, *J* = 13,6, 10,8 Hz), 3,01 (dd, 1H, *J* = 13,6, 9,7 Hz), 3,65 (bs, 1H), 4,30 (m, 1H), 6,81 (m, 1H), 6,92 (bs, 1H), 7,27 (m, 8H), 7,76 (dd, 2H, *J* = 14,3, 7,7 Hz), 8,93 (d, 1H, *J* = 3,4 Hz), 9,49 (d, 1H, *J* = 3,4 Hz) ; ¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 100 MHz) : δ ppm 35,1, 63,3, 112,6, 113,6, 114,2, 114,9, 116,2, 118,2, 122,2, 126,7, 128,3, 128,4, 129,0, 129,3, 131,0, 136,6, 146,4, 148,7, 154,7, 158,9, 182,2 ; FT-IR : γ_{max} (cm⁻¹) : 3234, 2396, 1724, 1622, 1544, 1480, 1417, 1340, 1249, 1219, 1130, 823 ; HPLC, Tr = 1,358 min ; MS (ESI⁺) : m/z 399,2 [M+H]⁺; HRMS calculé pour C₂₃H₁₉N₄O₃ 399,1457, trouvé 399,1459.

Composé 12d : (4S)-4-benzyl-2-(3,4,5-triméthoxyphényl)-3,4-dihydro-5H-pyrido[1',2':1,2]-imidazo[4,5-d][1,3]diazépin-5-one.

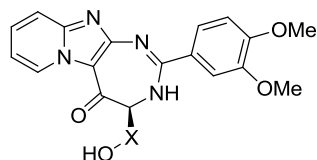


Solide jaune, m = 0,022 g, 24 %, pf : >300°C, Pureté > 98% ;

$[\alpha]_D^{20} = +2,57^\circ$ (c 0,35, CHCl₃) ; ¹H RMN (DMSO-*d*₆, 300 MHz) : δ ppm 3,34 (bs, 2H), 4,2 (bs, 1H), 6,80 (bs, 2H), 7,32-7,34 (m, 8H), 7,4 (bs, 2H), 9,2 (bs, 1H), 9,5 (bs, 1H) ; ¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 75 MHz) : δ ppm 29,0, 48,7, 103,1, 116,0, 126,6, 126,9, 128,4 (2C), 128,5 (2C), 129,4, 131,4, 136,9, 137,0, 138,4, 140,3 (2C), 145,5, 145,8, 151,9 (2C), 181,2, 185,0. FT-IR : γ_{max} (cm⁻¹) : 3356, 1618, 1482, 1426, 1379, 1337, 1254, 1179, 1131, 1051, 765 ; HPLC, Tr =

1,36 min ; MS (ESI⁺) : m/z 415,2 [M+H]⁺; HRMS calculé pour C₂₃H₁₉N₄O₄ 415,1406, trouvé 415,1409.

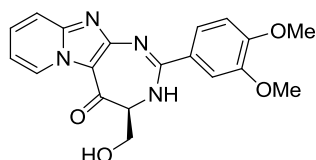
Procédure générale de synthèse des dérivés 4-hydroxyméthyle (**14**) et 4-hydroxybenzyle (**15**)



Une solution de 95 mg de composé **13a** ou **13g** dans du DCM est refroidie à 0°C. 5 mL d'une solution d'acide bromhydrique à 33% dans l'acide acétique sont ajoutés.

La solution résultante est agitée à TA pour une durée d'environ 3h (suivi réalisé par CCM). A la fin de la réaction, le solvant est éliminé et les composés **14** et **15** sont isolés avec des rendements respectifs de 93 et 99%.

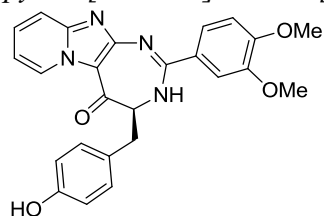
Composé 14 : (4S)-4-hydroxyméthyl-2-(3,4-diméthoxyphényl)-3,4-dihydro-5H-pyrido[1',2':1,2]imidazo[4,5-d][1,3]diazépin-5-one.



Gomme brune, m = 0,030 g, 93% ; Pureté > 98%

[α]_D²⁰ = +16,0° (c 0,175, DMSO) ; ¹H RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) : δ ppm 3,81-3,86 (m, 4H), 3,91 (s, 6H), 4,44 (m, 1H), 7,28 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz), 7,42-7,49 (m, 1H), 7,56 (d, 1H, *J* = 4,0 Hz), 7,63 (dd, 1H, *J* = 12,0, 4,0 Hz), 7,92 (d, 2H, *J* = 4,0 Hz), 9,52 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz) ; ¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 100 MHz) : δ ppm 55,9, 56,2, 60,0, 65,3, 111,5, 112,1, 113,9, 115,8, 116,4, 120,1, 125,6, 128,6, 133,2, 144,6, 148,3, 148,8, 154,6, 160,9, 179,4 ; HPLC, Tr = 1,7 min ; MS (ESI⁺) : m/z 367,2 [M+H]⁺; HRMS calculé pour C₁₉H₁₉N₄O₄ 367,1406, trouvé 367,1405.

Composé 15 : (4S)-4-(4-hydroxybenzyl)-2-(3,4-diméthoxyphényl)-3,4-dihydro-5H-pyrido[1',2':1,2]imidazo[4,5-d][1,3]diazépin-5-one.

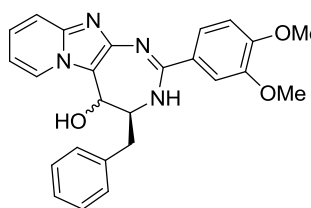


Solide jaune, m = 0,080 g, 99% ; pf : 167,0-168,0°C ; Pureté > 98%

[α]_D²⁰ = +36,4° (c 0,75, DMSO) ; ¹H RMN (DMSO-*d*₆, 300 MHz) : δ ppm 2,72 (m, 1H), 2,97

(m, 1H), 3,72 (s, 3H), 3,83 (s, 3H), 4,25 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz), 6,68 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz), 7,04-7,34 (m, 9H), 7,74 (bs, 1H), 9,29 (s, 1H), 9,48 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz) ; ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) : δ ppm 34,2, 55,4, 55,8, 64,0, 111,0, 112,0, 112,7, 114,5, 115,2, 115,7, 123,6, 123,9, 126,7, 128,0, 130,4, 131,3, 135,2, 145,7, 148,0, 152,6, 156,2, 158,0, 182,1 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3230, 3087, 3031, 2916, 1722, 1613, 1591, 1557, 1510, 1462, 1337, 1236, 1175, 1141, 1111, 1021, 843, 811, 762, 694 ; HPLC, Tr = 2,44 min ; MS (ESI^+) : m/z 443,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_4$ 443,1722, trouvé 443,1719.

Synthèse du composé 17 : (4S)-4-benzyl-2-(3,4-diméthoxyphényl)-4,5-dihydro-3H-pyrido[1',2':1,2]imidazo[4,5-d][1,3]diazépin-5-ol.

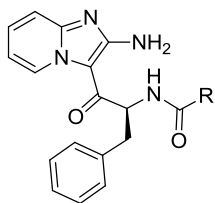


Une solution du produit **11j** (0,200g, 0,0469 mmol) dans 2 mL de méthanol est refroidie à 0°C dans un bain de glace. Ensuite, 3 équivalents de borohydrure de sodium (53,5 mg, 1,407 mmol) sont ajoutés et le mélange réactionnel est agité à 0°C pendant 3h.

La réaction est suivie par CCM. A la fin de la réaction, une hydrolyse est effectuée par ajout de 1 mL d'une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 . Le solvant est évaporé et le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle. La solution est décantée et lavée à l'aide d'une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 . La phase AcOEt est séchée sur Na_2SO_4 anhydre, filtrée puis condensée. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne d'alumine (éluant DCM/EtOH 98:2 v/v) pour donner le composé **16** sous forme d'un solide jaune clair.

Solide jaune pale, m = 0,030 g, 15% ; pf : 174,0°C-175,0°C ; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -45,31^\circ$ (c 0,49, DMSO) ; ^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) : δ ppm 1,23 (s, 1H), 3,72 (s, 4H), 3,81 (s, 5H), 5,40 (s, 1H), 5,87 (bs, 1H), 6,99 (bs, 2H), 7,00 (bs, 1H), 7,11-7,35 (m, 5H), 7,49 (bs, 3H), 8,36 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) : δ ppm 36,1, 55,5, 55,6, 60,0, 66,5, 110,9, 112,1, 112,3, 112,9, 115,5, 118,9, 122,8, 124,4, 125,0, 126,5, 128,5, 129,4, 138,9, 141,2, 144,9, 148,0, 152,0, 158,0 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3379, 2921, 2869, 2853, 1702, 1597, 1570, 1501, 1455, 1414, 1350, 1267, 1100, 1027, 948, 746, 707 ; HPLC, Tr = 2,27 min ; MS (ESI^+) : m/z 429,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_3$ 429,1924, trouvé 429,1927.

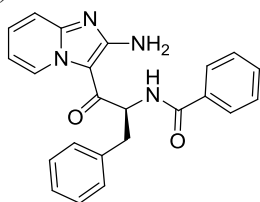
Procédure générale de synthèse des dérivés amides **20a-i**



A une solution de 0,1 g du composé **6a** (0,36 mmol) dans 10 mL de DCM refroidie à 0°C, sont ajoutés un dérivé acide carboxylique convenable (1,1 éq) et 1,1 éq de chacun des réactifs HOBT (53 mg), EDCI (75 mg) et Et₃N (39,5 mg ; 54 µL). Le mélange est agité à 0°C pendant 30 min, puis à TA

pendant 2 à 4h (suivi réactionnel par CCM). A la fin de la réaction, la solution est lavée avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (3 x 30 mL). Les phases organiques sont collectées, séchées sur Na₂SO₄ anhydre et le solvant est éliminé sous pression réduite. Le résidu est solubilisé dans le DCM et filtré sur alumine en utilisant un Büchner. Le solvant est ensuite évaporé sous vide pour donner les dérivés amides purs **20a-i** avec des rendements allant de 20 à 89%.

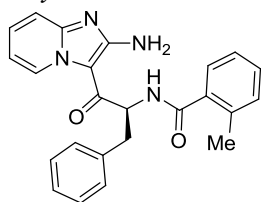
Composé 20a : (S)-N-(1-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-1-oxo-3-phénylpropan-2-yl)benzamide.



Solide blanc, m = 0,038 g, 68% ; pf : 214,0-215,0°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +96,59^\circ$ (c 0,44, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 3,24 (dd, 1H, J = 9,0, 6,0 Hz), 3,35 (dd, 1H, J = 9,0, 6,0 Hz), 5,78 (dd, 1H, J = 12,0, 3,0 Hz), 6,22 (bs, 2H), 6,65 (td, 1H, J = 6,0, 3,0 Hz), 7,13 (t, 1H, J = 6,0 Hz), 7,20 (t, 2H, J = 6,0 Hz), 7,26-7,30 (m, 4H), 7,33 (t, 2H, J = 6,0 Hz), 7,39-7,48 (m, 2H), 7,68 (d, 2H, J = 6,0 Hz), 9,60 (d, 1H, J = 6,0 Hz) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 38,6, 54,8, 102,0, 103,6, 113,3, 114,4, 125,9, 127,0, 127,2, 128,6, 128,7, 129,3, 131,1, 132,1, 148,0, 152,2, 163,4, 175,3, 177,0 ; FT-IR : γ_{max} (cm⁻¹) : 3311, 3184, 1633, 1574, 1526, 1495, 1455, 1339, 1263, 1054, 760, 695 ; HPLC, Tr = 1,62 min ; MS (ESI⁺) : m/z 385,2 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₂₃H₂₁N₄O₂ 385,1665, trouvé 385,1665.

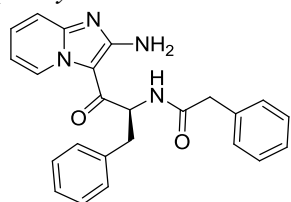
Composé 20b : (S)-N-(1-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-1-oxo-3-phénylpropan-2-yl)-2-méthylbenzamide.



Solide blanc, m = 0,111 g, 76% ; pf : 87,0-88,0°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +31,1^\circ$ (c 1,0, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 1,86 (bs, 1H), 2,21 (s, 3H), 3,26 (dd, 1H, $J = 13,9, 8,3$ Hz), 3,33 (dd, 1H, $J = 13,9, 6,3$ Hz), 5,80 (dd, 1H, $J = 13,9, 8,3$ Hz), 6,31 (s, 2H), 6,84 (td, 1H, $J = 13,8, 6,9$ Hz), 7,22 (m, 10H), 7,38 (td, 1H, $J = 15,8, 6,9$ Hz), 9,55 (bs, 1H) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 19,7, 38,4, 54,8, 113,2, 114,3, 125,7, 126,9, 127,0, 127,3, 128,6, 128,7, 129,4, 130,2, 131,0, 131,1, 135,3, 136,3, 136,8, 148,1, 159,3, 170,9, 184,0 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 3331, 3179, 2828, 1731, 1633, 1578, 1526, 1496, 1452, 1338, 1318, 1203, 1158, 1056, 735, 698 ; HPLC, Tr = 1,70 min ; MS (ESI⁺) : m/z 399,1 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₂₄H₂₃N₄O₂ 399,1821, trouvé 399,1820.

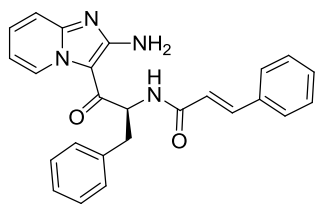
Composé 20c : (S)-N-(1-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-1-oxo-3-phénylpropan-2-yl)-2-phénylacétamide.



Solide jaune, m = 0,120 g, 84% ; pf : 161,0-162,0°C ; Pureté > 98%.

$[\alpha]_D^{20} = +23,8^\circ$ (c 0,5, DMSO) ; ¹H RMN (DMSO-*d*₆, 300 MHz) : δ ppm 3,06 (dd, 1H, $J = 13,6, 8,0$ Hz), 3,15 (dd, 1H, $J = 13,6, 6,0$ Hz), 3,35 (bs, 1H), 3,48 (d, 1H, $J = 14,0$ Hz), 3,55 (d, 1H, $J = 14,0$ Hz), 5,33 (dd, 1H, $J = 13,0, 8,0$ Hz), 6,96 (s, 2H), 7,02 (t, 1H, $J = 6,8$ Hz), 7,21 (m, 10H), 7,36 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz), 7,54 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 9,15 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz) ; ¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 75 MHz) : δ ppm 37,2, 41,2, 54,4, 107,1, 112,7, 113,6, 126,2, 126,3, 128,0, 128,1, 129,0, 129,1, 130,8, 135,8, 136,9, 137,6, 147,2, 158,8, 171,4, 183,7 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 3326, 3195, 3003, 2922, 1630, 1646, 1522, 1574, 1494, 1454, 1337, 1317, 1264, 1065, 759, 716, 694 ; HPLC, Tr = 1,6 min ; MS (ESI⁺) : m/z 399,1 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₂₄H₂₃N₄O₂ 399,1821, trouvé 399,1818.

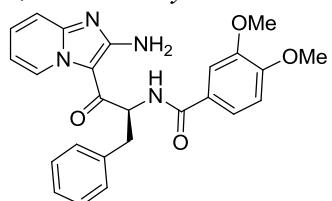
Composé 20d : (S)-N-(1-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-1-oxo-3-phénylpropan-2-yl)cinnamamide.



Solide jaune, m = 0,017 g, 20% ; pf : 85,0-86,0°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +16,5^\circ$ (c 0,6, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 1,85 (bs, 1H), 3,22 (dd, 1H, $J = 13,8, 7,5$ Hz), 3,34 (dd, 1H, $J = 13,9, 6,6$ Hz), 5,76 (dd, 1H, $J = 15,9, 7,4$ Hz), 6,28 (s, 2H), 6,37 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz), 6,87 (t, 1H, $J = 6,8$ Hz), 7,06-7,44 (m, 12H), 7,56 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz), 9,62 (bs, 1H) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 38,6, 54,6, 113,3, 114,4, 119,7, 127,0, 128,0, 128,3, 128,6, 128,9, 129,3, 130,1, 131,1, 134,6, 136,7, 142,4, 148,2, 159,6, 166,8, 166,8, 184,6 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 3285, 3185, 2974, 1720, 1574, 1494, 1455, 1337, 1265, 1221, 979, 753, 731, 683 ; HPLC, Tr = 1,5 min ; MS (ESI⁺) : m/z 411,1 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₂₅H₂₃N₄O₂ 411,1821, trouvé 411,1821.

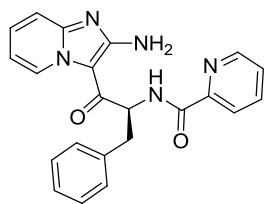
Composé 20e : (S)-N-(1-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-1-oxo-3-phénylpropan-2-yl)-3,4-diméthoxybenzamide.



Solide blanc, m = 0,141 g, 89% ; pf : 85,0-86,0°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +47,2^\circ$ (c 1,0, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 1,99 (bs, 1H), 3,25 (dd, 1H, $J = 12,0, 6,0$ Hz), 3,34 (dd, 1H, $J = 15,0, 6,0$ Hz), 3,83 (s, 3H), 3,86 (s, 3H), 5,77 (dd, 1H, $J = 15,0, 6,0$ Hz), 6,27 (bs, 2H), 6,72 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz), 6,82 (td, 1H, $J = 6,0, 3,0$ Hz), 7,11-7,24 (m, 4H), 7,29-7,42 (m, 5H), 9,59 (bs, 1H) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 29,8, 38,6, 54,8, 56,1, 110,4, 110,7, 113,2, 114,4, 120,1, 126,1, 126,9, 128,6, 129,1, 129,6, 129,9, 131,1, 136,8, 148,0, 149,1, 152,3, 159,3, 167,9, 184,5 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 3331, 2925, 2852, 1724, 1577, 1542, 1494, 1440, 1339, 1262, 1229, 1055, 1019, 757, 698 ; HPLC, Tr = 1,35 min ; MS (ESI⁺) : m/z 445,1 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₂₅H₂₅N₄O₄ 445,1876, trouvé 445,1877.

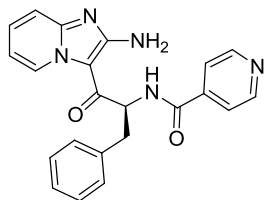
Composé 20f : (S)-N-(1-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-1-oxo-3-phénylpropan-2-yl)picolinamide.



Solide jaune, m = 0,045 g, 53% ; pf : 74,0-75,0°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +62,8^\circ$ (c 0,53, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 3,23 (dd, 1H, $J = 13,6, 7,4$ Hz), 3,40 (dd, 1H, $J = 13,7, 7,0$ Hz), 5,78 (dd, 1H, $J = 16,9, 7,3$ Hz), 6,86 (td, 1H, $J = 6,8, 1,4$ Hz), 7,11-7,44 (m, 10H), 7,8 (td, 1H, $J = 7,7, 1,8$ Hz), 8,10 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz), 8,57 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz), 8,78 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz), 9,64 (bs, 1H) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 38,6, 54,5, 108,7, 113,2, 114,4, 122,5, 125,5, 126,7, 126,8, 128,6, 129,3, 130,9, 136,9, 137,5, 147,9, 148,6, 149,1, 159,1, 165,2, 183,7 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 3312, 3187, 3026, 1659, 1577, 1523, 1495, 1448, 1339, 1265, 1223, 1146, 1063, 753, 698 ; HPLC, Tr = 1,59 min ; MS (ESI⁺) : m/z 386,2 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₂₂H₂₀N₅O₂ 386,1617, trouvé 386,1618.

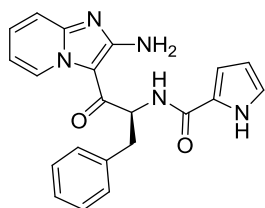
Composé 20g : (S)-N-(1-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-1-oxo-3-phénylpropan-2-yl)isonicotinamide.



Solide jaune, m = 0,086 g, 80% ; pf : 205,0-206,0°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +69,5^\circ$ (c 0,4, CHCl₃) ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 3,30 (dd, 1H, $J = 13,8, 7,4$ Hz), 3,4 (dd, 1H, $J = 13,8, 6,7$ Hz), 5,76 (dd, 1H, $J = 15,5, 6,9$ Hz), 5,98 (s, 2H), 6,9 (td, 1H, $J = 6,9, 1,3$ Hz), 7,20-7,32 (m, 5H), 7,44 (td, 1H, $J = 7,0, 1,1$ Hz), 7,53 (d, 4H, $J = 6,0$ Hz), 8,67 (dd, 2H, $J = 4,6, 1,4$ Hz), 9,55 (bs, 1H) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) : δ ppm 38,6, 54,9, 108,6, 113,6, 114,6, 121,1, 127,3, 128,5, 128,8, 129,4, 129,9, 131,4, 136,3, 140,9, 148,2, 150,8, 159,3, 166,5 ; FT-IR : γ_{\max} (cm⁻¹) : 3311, 3188, 1650, 1579, 1495, 1455, 1339, 1310, 1265, 1063, 846, 752, 696, 667 ; HPLC, Tr = 1,19 min ; MS (ESI⁺) : m/z 386,2 [M+H]⁺ ; HRMS calculé pour C₂₂H₂₀N₅O₂ 386,1617, trouvé 386,1619.

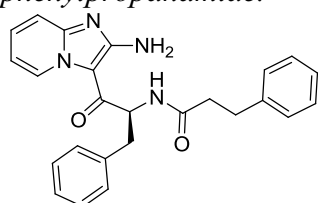
Composé 20h : (S)-N-(1-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-1-oxo-3-phénylpropan-2-yl)-1H-pyrrole-2-carboxamide.



Solide jaune, m = 0,117 g, 88% ; pf : 197,5-198,5°C ;
Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +15,8^\circ$ (c 0,54, DMSO) ; ^1H RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz) : δ ppm 3,12 (dd, 1H, $J = 13,5, 7,0$ Hz), 3,21 (dd, 1H, $J = 13,5, 7,0$ Hz), 5,46 (dd, 1H, $J = 13,0, 7,0$ Hz), 6,1 (m, 1H), 6,87 (m, 1H), 6,95 (t, 1H, $J = 8,1$ Hz), 7,02 (m, 1H), 7,1-7,25 (m, 7H), 7,33 (t, 1H, $J = 7,2$ Hz), 7,48 (t, 1H, $J = 7,4$ Hz), 8,8 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz), 9,55 (d, 1H, $J = 6,6$ Hz), 11,48 (s, 1H) ; ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 75 MHz) : δ ppm 37,0, 54,3, 107,3, 108,8, 111,6, 112,6, 113,6, 122,1, 124,8, 126,2, 128,0, 128,3, 129,0, 130,7, 138,0, 147,2, 158,8, 161,2, 184,0 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3305, 3194, 1577, 1556, 1495, 1442, 1338, 1264, 1193, 1129, 1041, 844, 733, 696 ; HPLC, Tr = 1,54 min ; MS (ESI^+) : m/z 374,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_2$ 374,1617, trouvé 374,1616.

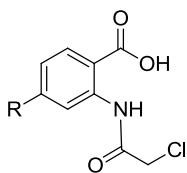
Composé 20i : (S)-N-(1-(2-aminoimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-1-oxo-3-phénylpropan-2-yl)-3-phénylpropanamide.



Solide blanc, m = 0,085 g, 59% ; pf : 69,0°C-70,0°C ; Pureté > 98%

$[\alpha]_D^{20} = +69,0^\circ$ (c 1,0, CHCl_3) ; ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) : δ ppm 2,43 (t, 2H, $J = 9,0$ Hz), 2,83 (t, 2H, $J = 9,0$ Hz), 3,04 (dd, 1H, $J = 12,0, 6,0$ Hz), 3,18 (dd, 1H, $J = 15,0, 6,0$ Hz), 5,58 (dd, 1H, $J = 15,0, 6,0$ Hz), 6,29 (bs, 2H), 6,81 (td, 1H, $J = 9,0, 3,0$ Hz), 6,94-7,18 (m, 11H), 7,28 (bs, 1H), 7,37 (td, 1H, $J = 9,0, 3,0$ Hz), 9,58 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) : δ ppm 31,6, 38,0, 38,3, 54,2, 108,4, 113,2, 114,3, 126,3, 126,9, 128,3, 128,6, 129,2, 131,1, 136,8, 140,5, 148,0, 159,4, 173,2, 184,3 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3325, 3178, 3028, 1734, 1644, 1571, 1495, 1452, 1339, 1264, 1065, 762 ; HPLC, Tr = 1,6 min ; MS (ESI^+) : m/z 413,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_2$ 413,1978, trouvé 413,1981.

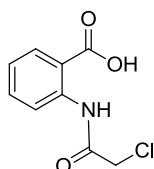
Synthèse des dérivés acides 2-(2-chloroacétamido)benzoïques



A une solution de 2 g de dérivé d'acide anthranilique (1 éq.) dans 20 mL de dichlorométhane, est ajoutée une quantité équimolaire de triéthylamine. Après refroidissement du mélange à 0°C, un équivalent de chlorure de chloroacétyle

est ajouté lentement (par fraction sur 15 min environ) et la solution est agitée à température ambiante pendant 6h. L'évolution de la réaction est suivie par CCM (AcOEt/Hexane 1:5, v/v). A la fin de la réaction, la solution est filtrée et le précipité obtenu est lavé plusieurs fois à l'eau, puis séché à l'aide d'un dessiccateur chauffant. Les composés **34a** et **34b** sont obtenus sous la forme d'un solide blanc avec des rendements respectifs de 90 et 71%.

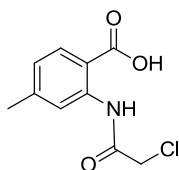
Composé 34a : acide 2-(2-chloroacétamido)benzoïque.



Solide blanc, m = 2,676 g, 90% ; Pureté > 98%

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) : δ ppm 4,22 (s, 2H), 7,18 (t, 1H, $J = 9,0$ Hz), 7,60 (t, 1H, $J = 9,0$ Hz), 8,15 (dd, 1H, $J = 9,0, 3,0$ Hz), 8,71 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz), 11,95 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) : δ ppm 43,4, 120,6, 123,8, 127,8, 132,0, 135,2, 140,9, 164,3, 165,4 ; HPLC, Tr = 2,20 min ; MS (ESI^+) : m/z 214,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; (ESI^-) : m/z 212,2 $[\text{M}-\text{H}]^-$; $\text{C}_9\text{H}_8\text{ClNO}_3$.

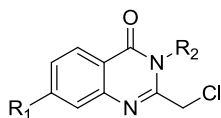
Composé 34b : acide 2-(2-chloroacétamido)-4-méthylbenzoïque.



Solide blanc, m = 2,08 g, 71% ; Pureté > 98%

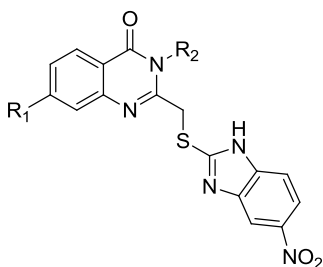
^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) : δ ppm 2,35 (s, 3H), 4,42 (s, 2H), 7,00 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz), 7,88 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz), 8,31 (s, 1H) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) : δ ppm 22,4, 43,4, 112,4, 121,1, 124,8, 132,0, 140,7, 147,2, 165,3, 171,4 ; HPLC, Tr = 2,75 min ; MS (ESI^+) : m/z 228,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Formule brute : $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{ClNO}_3$.

Synthèse des 2-(chlorométhyl)-3-arylquinazolin-4-ones substituées **32a-p**



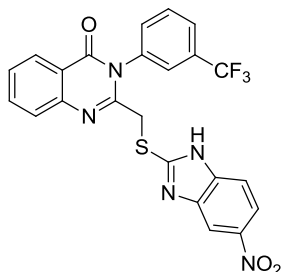
A une solution de 1 équivalent de composé **34** dans 10 mL de toluène, est ajoutée une quantité équimolaire de dérivé aniline. Ensuite, 7 équivalents de PCl_3 sont ajoutés et le mélange est agité à reflux du toluène pendant 6 à 10h. L'avancement de la réaction est suivi par HPLC. A la fin de la réaction, le solvant est éliminé par évaporation et le résidu est repris avec de l'eau. La solution est neutralisée avec du bicarbonate de sodium et extraite avec du chloroforme. La phase organique est ensuite séchée sur Na_2SO_4 , puis condensée sous pression réduite. Les composés **32a-p**, isolés avec des rendements bruts allant de 38 à 99%, sont utilisés tels quels pour l'étape suivante.

Obtention des composés nitrés **36**



A une solution d'un équivalent de 2-(chlorométhyl)-3-arylquinazolin-4-one **32a-p** dans 5 mL d'éthanol, est ajouté un équivalent de 2-mercapto-5-nitro-benzimidazole puis 0,2 mL d'une solution aqueuse de soude 5N. La solution est agitée à TA pendant 2h (Suivi réactionnel par CCM). A la fin de la réaction, la solution est filtrée sous-vide sur un fritté et lavée à l'éther. Les composés **36a-p** sont isolés sous la forme d'une poudre avec des rendements de 21 à 91%.

Composé 36a : 2-(((5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-3-(3-(trifluorométhyl)-phényl)quinazolin-4(3H)-one.

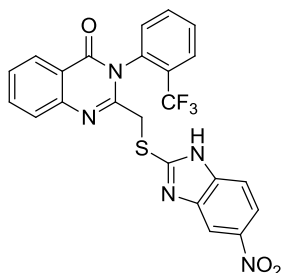


Solide jaune, m = 0,468 g, 32%, Pureté > 98%.

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) : δ ppm 4,45 (dd, 2H, $J = 20,0, 16,0$ Hz), 7,53 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,57 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,71 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,76-7,83 (m, 2H), 7,89 (t, 1H, $J =$

8,0 Hz), 7,95 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 8,02 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 8,10 (s, 1H), 8,14 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 8,23 (s, 1H), 13,28 (s, 1H) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) : δ ppm 35,9, 106,7, 110,6, 113,0, 117,6, 120,6, 122,3, 125,3, 126,3, 126,5, 127,0, 127,4, 130,0, 130,4, 130,8, 133,5, 135,0, 137,2, 140,2, 146,6, 151,9, 154,4, 161,2 ; HPLC, Tr = 3,07 min ; MS (ESI^+) : m/z 498,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Formule brute : $\text{C}_{23}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$.

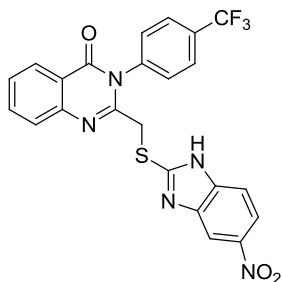
Composé 36b : 2-(((5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-3-(2-(trifluorométhyl)-phényl)quinazolin-4(3H)-one.



Solide jaune, m = 0,568 g, 82%, Pureté > 98%.

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) : δ ppm 4,44 (ABX, 2H), 7,55 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,61 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,72 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,76 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,80-7,93 (m, 3H), 8,01-8,06 (m, 2H), 8,15 (dd, 1H, $J = 8,0, 4,0$ Hz), 8,24 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz), 13,30 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) : δ ppm 35,6, 117,5, 119,0, 120,2, 121,7, 124,5, 126,0, 126,3, 126,6, 126,9, 127,1, 127,8, 127,9, 130,8, 131,9, 133,8, 134,5, 135,4, 142,2, 144,6, 146,4, 151,7, 161,0 ; HPLC, Tr = 3,35 min ; MS (ESI^+) : m/z 497,9 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Formule brute : $\text{C}_{23}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$.

Composé 36c : 2-(((5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-3-(4-(trifluorométhyl)-phényl)quinazolin-4(3H)-one.

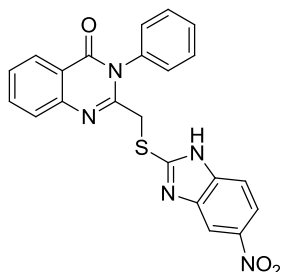


Solide jaune, m = 0,340 g, 55%, Pureté > 98%.

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) : δ ppm 4,45 (s, 2H), 7,53 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz), 7,58 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,72 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,85-7,93 (m, 6H), 8,02 (dd, 1H, $J = 8,0, 4,0$ Hz), 8,13 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz), 8,23 (s, 1H) ; ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) : δ ppm 36,0, 117,4, 120,6, 125,2, 126,5, 126,7 (2C), 127,0, 127,4, 127,9, 129,2, 129,6, 129,9, 130,3 (2C), 133,5,

135,1, 140,2, 142,1, 146,6, 151,7, 155,3, 161,1 ; HPLC, Tr = 3,38 min ; MS (ESI⁺) : m/z 498,0 [M+H]⁺ ; Formule brute : C₂₃H₁₄F₃N₅O₃S.

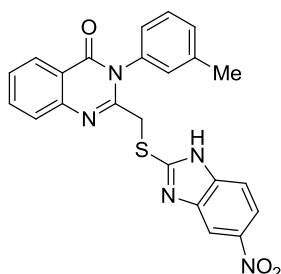
Composé 36d : 2-(((5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-3-phénylquinazolin-4(3H)-one.



Solide jaune, m = 0,499 g, 83%, Pureté > 98%.

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) : δ ppm 4,4 (s, 2H), 7,50-7,59 (m, 7H), 7,69 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz), 7,85 (t, 1H, *J* = 12,0 Hz), 8,03 (d, 1H, *J* = 12,0 Hz), 8,13 (d, 1H, *J* = 12,0 Hz), 8,25 (s, 1H), 13,25 (s, 1H) ; ¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 100 MHz) : δ ppm 36,1, 110,3, 113,4, 117,2, 120,7, 126,5, 126,9, 127,2, 128,8 (2C), 129,4, 129,6 (2C), 134,8, 136,5, 139,6, 141,9, 144,0, 146,6, 152,1, 155,9, 161,1 ; HPLC, Tr = 3,07 min ; MS (ESI⁺) : m/z 430,1 [M+H]⁺ ; Formule brute : C₂₂H₁₅N₅O₃S.

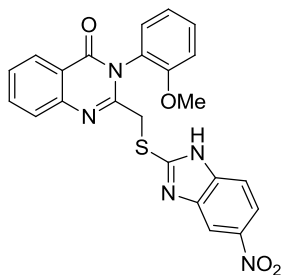
Composé 36f : 2-(((5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-3-(*m*-tolyl)quinazolin-4(3H)-one.



Solide beige, m = 0,495 g, 80%, Pureté > 98%.

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 300 MHz) : δ ppm 2,34 (s, 3H), 4,44 (ABX, 2H), 7,28 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz), 7,36-7,48 (m, 3H), 7,57 (t, 2H, *J* = 9,0 Hz), 7,69 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz), 7,86 (td, 1H, *J* = 9,0, 3,0 Hz), 8,02 (dd, 1H, *J* = 9,0, 3,0 Hz), 8,12 (dd, 1H, *J* = 9,0, 3,0 Hz), 8,24 (s, 1H) ; ¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 75 MHz) : δ ppm 20,8, 36,0, 98,4, 117,4, 120,6, 125,8, 126,4, 126,9, 127,2, 129,2, 129,5, 130,0, 130,5, 131,9, 134,8, 135,5, 136,1, 136,3, 139,1, 142,1, 146,6, 152,2, 161,0 ; HPLC, Tr = 3,19 min ; MS (ESI⁺) : m/z 444,0 [M+H]⁺ ; Formule brute : C₂₃H₁₇N₅O₃S.

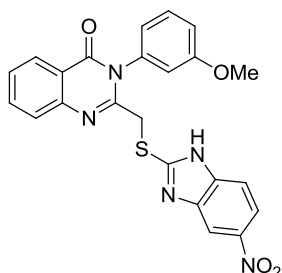
Composé 36g : 3-(2-méthoxyphényl)-2-(((5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-quinazolin-4(3H)-one.



Solide beige, m = 0,450 g, 91%, Pureté > 98%.

^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) : δ ppm 3,78 (s, 3H), 4,44 (ABX, 2H), 7,12 (td, 1H, $J = 8,0$, 4,0 Hz), 7,26 (dd, 1H, $J = 8,0$, 4,0 Hz), 7,47-7,60 (m, 4H), 7,70 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz), 7,88 (td, 1H, $J = 8,0$, 4,0 Hz), 8,03 (dd, 1H, $J = 8,0$, 4,0 Hz), 8,12 (dd, 1H, $J = 8,0$, 4,0 Hz), 8,25 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz), 13,66 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) : δ ppm 35,5, 55,9, 112,7, 113,0, 117,5, 120,5, 121,0, 124,4, 126,5, 127,0, 127,4, 129,0, 129,4, 130,1, 131,3, 132,8, 135,0, 142,1, 146,6, 147,0, 152,7, 154,4, 160,6 ; HPLC, Tr = 3,08 min ; MS (ESI $^+$) : m/z 460,0 [M+H] $^+$; Formule brute : C₂₃H₁₇N₅O₃S.

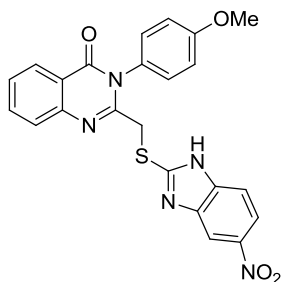
Composé 36h : 3-(3-méthoxyphényl)-2-(((5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-quinazolin-4(3H)-one.



Solide beige, m = 0,320 g, 65%, Pureté > 98%.

^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) : δ ppm 3,77 (s, 3H), 4,47 (s, 2H), 7,05 (ddd, 1H, $J = 8,0$, 4,0, 0,8 Hz), 7,14 (ddd, 1H, $J = 8,0$, 4,0, 0,8 Hz), 7,20 (t, 1H, $J = 4,0$ Hz), 7,48 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,57 (td, 2H, $J = 8,0$, 4,0 Hz), 7,69 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,86 (td, 1H, $J = 8,0$, 4,0 Hz), 8,03 (dd, 1H, $J = 8,0$, 4,0 Hz), 8,13 (dd, 1H, $J = 8,0$, 4,0 Hz), 8,25 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz), 13,66 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) : δ ppm 36,0, 55,4, 114,6, 115,1, 117,5, 119,4, 120,7, 120,9, 126,5, 126,9, 127,3, 129,4, 130,4, 134,9, 137,5, 140,9, 142,1, 143,9, 146,6, 152,2, 155,6, 160,1, 161,0 ; HPLC, Tr = 3,04 min ; MS (ESI $^+$) : m/z 460,0 [M+H] $^+$; Formule brute : C₂₃H₁₇N₅O₃S.

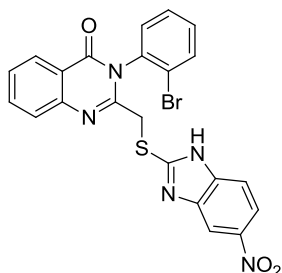
Composé 36i : 3-(4-méthoxyphényl)-2-(((5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-quinazolin-4(3H)-one.



Solide beige, m = 0,355 g, 72%, Pureté > 98%.

^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) : δ ppm 3,76 (s, 3H), 4,45 (s, 2H), 7,05 (dd, 2H, $J = 8,0, 4,0$ Hz), 7,45-7,49 (m, 2H), 7,56 (td, 2H, $J = 8,0, 4,0$ Hz), 7,69 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,86 (td, 1H, $J = 8,0, 4,0$ Hz), 8,03 (d, 1H, $J = 8,0, 4,0$ Hz), 8,12 (dd, 1H, $J = 8,0, 4,0$ Hz), 8,26 (bs, 1H), 13,64 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) : δ ppm 36,2, 55,3, 110,7, 112,9, 114,7 (2C), 117,5, 119,7, 120,7, 120,9, 126,5, 126,9, 127,2, 128,8, 130,0 (2C), 134,8, 140,3, 142,2, 146,6, 152,7, 159,6, 161,4 ; HPLC, Tr = 3,03 min ; MS (ESI $^+$) : m/z 460,0 [M+H] $^+$; Formule brute : C₂₃H₁₇N₅O₃S.

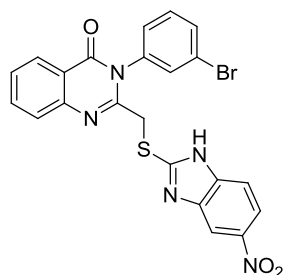
Composé 36j : 3-(2-bromophényl)-2-(((5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-quinazolin-4(3H)-one.



Solide jaune, m = 0,277 g, 39%, Pureté > 98%.

^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) : δ ppm 4,44 (ABX, 2H), 7,46 (td, 1H, $J = 9,0, 3,0$ Hz), 7,55 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz), 7,58-7,64 (m, 2H), 7,73 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz), 7,82 (dd, 1H, $J = 6,0, 3,0$ Hz), 7,87-7,95 (m, 2H), 8,03 (dd, 1H, $J = 9,0, 3,0$ Hz), 8,17 (dd, 1H, $J = 9,0, 3,0$ Hz), 8,25 (d, 1H, $J = 3,0$ Hz), 13,25 (s, 1H) ; ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) : δ ppm 36,1, 97,3, 117,5, 120,4, 122,5, 126,6, 127,1, 127,7, 129,0, 129,3, 131,2, 131,7, 133,5, 135,3, 135,4, 141,6, 142,2, 146,5, 151,5, 155,0, 160,3, 162,3 ; HPLC, Tr = 3,31 min ; MS (ESI $^+$) : m/z 508,0 [M+H] $^+$, 510,0 [M+2+H] $^+$; Formule brute : C₂₂H₁₄BrN₅O₃S.

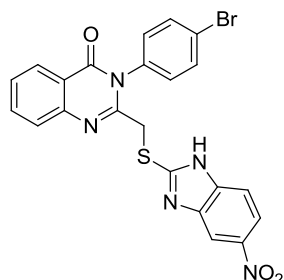
Composé 36k : 3-(3-bromophényl)-2-(((5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-quinazolin-4(3H)-one.



Solide jaune, m = 0,317 g, 45%, Pureté > 98%.

^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) : δ ppm 4,45 (ABX, 2H), 7,49-7,71 (m, 7H), 7,85-7,90 (m, 2H), 8,03 (dd, 1H, $J = 9,0, 3,0$ Hz), 8,12 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz), 8,27 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) : δ ppm 36,0, 117,5, 119,0, 120,6, 121,9, 122,6, 126,5, 127,0, 127,4, 128,3, 128,6, 129,0, 131,4, 132,0, 132,4, 135,0, 137,8, 142,2, 146,6, 151,8, 155,3, 161,1 ; HPLC, Tr = 3,32 min ; MS (ESI $^+$) : m/z 508,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 510,0 $[\text{M}+2+\text{H}]^+$; Formule brute : $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{BrN}_5\text{O}_3\text{S}$

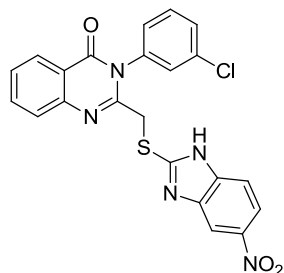
Composé 36l : 3-(4-bromophényl)-2-(((5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-quinazolin-4(3H)-one.



Solide brun, m = 0,216 g, 30%, Pureté > 98%.

^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) : δ ppm 4,45(s, 2H), 7,54-7,60 (m, 4H), 7,55 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz), 7,69-7,74 (m, 3H), 7,88 (td, 1H, $J = 8,0, 4,0$ Hz), 8,03 (dd, 1H, $J = 8,0, 4,0$ Hz), 8,14 (dd, 1H, $J = 8,0, 4,0$ Hz), 8,28 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz) ; ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) : δ ppm 36,5, 109,9, 117,2, 120,6, 126,5, 127,0 (2C), 127,3, 128,0 (2C), 129,2, 129,5, 131,1, 131,7, 133,6, 135,0, 137,8, 143,2, 146,7, 152,3, 161,1, 165,9 ; HPLC, Tr = 3,30 min ; MS (ESI $^+$) : m/z 508,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 510,0 $[\text{M}+2+\text{H}]^+$; Formule brute : $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{BrN}_5\text{O}_3\text{S}$.

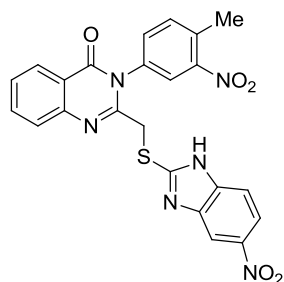
Composé 36m : 3-(3-chlorophényl)-2-(((5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-quinazolin-4(3H)-one.



Solide jaune clair, m = 0,220 g, 34%, Pureté > 98%.

^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) : δ ppm 4,46 (ABX, 2H), 7,52-7,60 (m, 5H), 7,70 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,77-7,78 (m, 1H), 7,88 (td, 1H, $J = 8,0, 4,0$ Hz), 8,03 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 8,13 (dd, 1H, $J = 8,0, 4,0$ Hz), 8,27 (bs, 1H), 13,29 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) : δ ppm 36,0, 106,8, 110,7, 113,1, 117,2, 117,7, 120,6, 126,5, 127,0, 127,4, 128,0, 129,2, 129,8, 131,1, 133,6, 135,0, 137,8, 140,1, 142,7, 146,6, 151,8, 161,1 ; HPLC, Tr = 3,34 min ; MS (ESI^+) : m/z 464,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 465,0 $[\text{M}+2+\text{H}]^+$; Formule brute : $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{ClN}_5\text{O}_3\text{S}$.

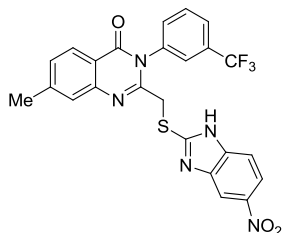
Composé 36n : 3-(4-méthyl-3-nitrophényl)-2-(((5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)quinazolin-4(3H)-one.



Solide beige, m = 0,432 g, 68%, Pureté > 98%.

^1H RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz) : δ ppm 2,37 (s, 3H), 4,52 (s, 2H), 7,51-7,61 (m, 3H), 7,71 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz), 7,84-7,92 (m, 2H), 8,03 (d, 1H, $J = 9,0, 3,0$ Hz), 8,14 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz), 8,23 (d, 1H, $J = 3,0$ Hz), 8,31 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz) ; ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 75 MHz) : δ ppm 19,1, 35,7, 117,4, 119,7, 120,6, 125,4, 126,4, 127,0 (2C), 127,4, 133,7, 134,0, 134,2, 134,9 (2C), 135,0, 142,1, 146,6, 148,9, 151,9 (2C), 155,0, 161,2 ; HPLC, Tr = 3,25 min ; MS (ESI^+) : m/z 489,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Formule brute : $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}$.

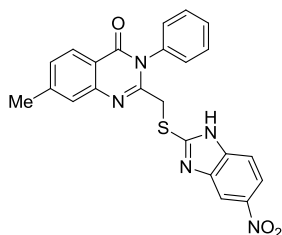
Composé 36o : 7-méthyl-2-(((5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-3-(3-(trifluorométhyl)phényl)quinazolin-4(3H)-one.



Solide beige, m = 0,850 g, 61%, Pureté > 98%.

^1H RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz) : δ ppm 2,48 (bs, 3H), 7,42 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz), 7,53 (bs, 1H), 7,54 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz), 7,79 (d, 3H, $J = 6,0$ Hz), 7,91 (d, 2H, $J = 9,0$ Hz), 8,01-8,07 (m, 4H), 8,23 (d, 1H, $J = 3,0$ Hz) ; ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 75 MHz) : δ ppm 19,1, 35,7, 106,7, 110,6, 113,0, 117,6, 120,6, 122,3, 125,3, 126,3, 126,5, 127,0, 127,4, 130,0, 130,4, 130,8, 133,5, 135,0, 137,2, 140,2, 146,6, 151,9, 154,4, 161,2; HPLC, Tr = 3,25 min ; MS (ESI $^+$) : m/z 512,0 [M+H] $^+$; Formule brute : C₂₄H₁₆F₃N₅O₃S.

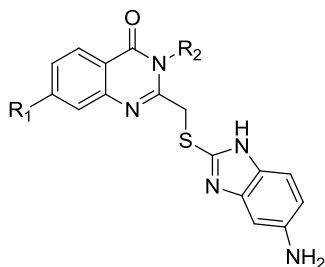
Composé 36p : 7-méthyl-2-(((5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-3-phényl-quinazolin-4(3H)-one.



Solide jaune, m = 0,242 g, 78%, Pureté > 98%.

^1H RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz) : δ ppm 2,48 (bs, 3H), 4,40 (bs, 2H), 7,39 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz), 7,45-7,64 (m, 7H), 8,02 (d, 2H, $J = 9,0$ Hz), 8,24 (d, 1H, $J = 3,0$ Hz) ; ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 75 MHz) : δ ppm 21,3, 36,1, 117,7, 118,2, 119,4, 124,6, 126,3, 126,5, 126,6, 127,8, 128,5, 128,8 (2C), 129,2, 129,3, 129,6 (2C), 136,5, 145,4, 146,7, 152,1, 155,8, 160,9 ; HPLC, Tr = 3,22 min ; MS (ESI $^+$) : m/z 444,1 [M+H] $^+$; Formule brute : C₂₃H₁₇N₅O₃S.

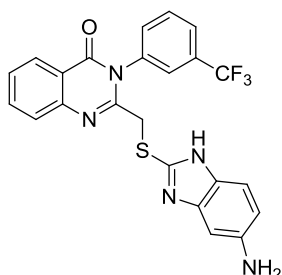
Obtention des quinazolinones 37



Une solution d'un équivalent de dérivé **36a-p** et de 10 équivalents de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 15 mL MeOH est agitée à reflux toute une nuit. A la fin de la réaction, le solvant est évaporé à sec et le résidu est repris dans du dichlorométhane. Une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 est ajoutée et le mélange est agité à TA pendant 16h. La solution est filtrée

sur Celite et les phases sont séparées. La phase aqueuse est ensuite extraite avec du dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées et lavées à l'eau, séchées sur Na_2SO_4 et condensées sous pression réduite. Le résidu est purifié par colonne chromatographique de gel de silice si besoin. Les quinazolinones cibles **37a-p** sont isolées sous forme d'un solide beige avec des rendements variant entre 50 et 93%.

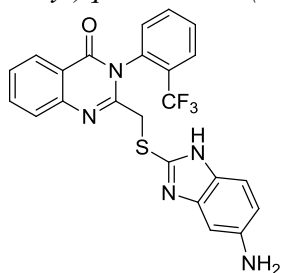
Composé 37a : 2-(((5-amino-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-3-(3-(trifluorométhyl)-phényl)quinazolin-4(3H)-one.



Solide jaune, m = 0,120 g, 91% ; pf : 135,0-140,0°C ; Pureté > 98%

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) : δ ppm 3,98 (m, 2H), 6,58 (dd, 1H, $J = 6,0, 3,0$ Hz), 6,75 (bs, 1H), 7,27 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz), 7,52-7,68 (m, 5H), 7,72 (t, 3H, $J = 12,0$ Hz), 7,81 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 8,26 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) : δ ppm 35,9, 112,5, 119,3, 121,0, 122,0, 124,7, 126,0, 126,8, 127,7, 128,3, 131,1, 132,5, 132,7, 133,0, 135,5 (2C), 136,7, 142,7, 146,3, 146,7, 153,7, 157,7, 161,8 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3067, 2917, 1680, 1634, 1602, 1589, 1568, 1472, 1443, 1328, 1268, 1166, 1124, 1069, 805, 771, 698 ; HPLC, Tr = 2,44 min ; MS (ESI^+) : m/z 468,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$ 468,1106, trouvé 468,1104.

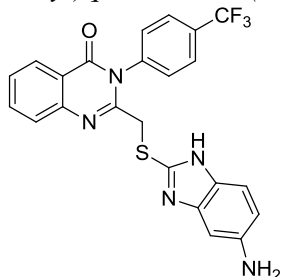
Composé 37b : 2-(((5-amino-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-3-(2-(trifluorométhyl)-phényl)quinazolin-4(3H)-one.



Solide marron, m = 0,070 g, 53%, Pureté > 98%

^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) : δ ppm 4,17 (bs, 2H), 4,85 (bs, 2H), 6,42 (m, 2H), 7,07 (m, 1H), 7,60 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,70 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,75-7,80 (m, 1H), 7,87-7,93 (m, 3H), 8,00 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 8,13 (dd, 1H, $J = 8,0, 1,2$ Hz) ; ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) : δ ppm 36,1, 94,0, 110,5, 117,5, 120,0, 121,6, 124,3, 126,1, 126,4, 127,0, 127,5, 127,6, 127,7 (2C), 130,7, 131,9, 133,8, 134,2, 135,2, 144,5, 146,4, 152,1, 161,0 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3349, 3047, 2917, 1683, 1632, 1598, 1473, 1453, 1408, 1350, 1314, 1286, 1214, 1173, 1108, 1059, 1035, 806, 769, 696 ; HPLC, Tr = 2,26 min ; MS (ESI^+) : m/z 468,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{OS}$ 468,1106, trouvé 468,1104.

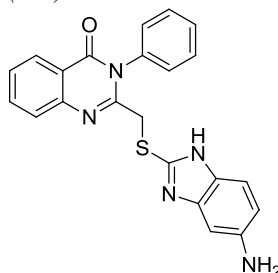
Composé 37c : 2-(((5-amino-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-3-(4-(trifluorométhyl)-phényl)quinazolin-4(3H)-one.



Solide rose pâle, m = 0,050 g, 53%, pf : 205,8 – 208,2°C, Pureté > 98%

^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) : δ ppm 4,26 (s, 2H), 6,46 (dd, 1H, $J = 8,5, 1,8$ Hz), 6,54 (bs, 1H), 7,06 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz), 7,55 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,67 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz), 7,68-8,0 (m, 5H), 8,13 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz) ; ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) : δ ppm 36,5, 96,2, 110,9, 120,5, 122,4, 125,1, 126,4, 126,5, 126,6, 126,9 (2C), 127,2, 129,5, 129,8, 130,2 (2C), 134,9, 140,2, 143,7, 144,5, 146,6, 152,0, 161,1 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3369, 3067, 2789, 1683, 1633, 1591, 1470, 1413, 1324, 1283, 1165, 1126, 1104, 1065, 1020, 831, 696 ; HPLC, Tr = 2,38 min ; MS (ESI^+) : m/z 468,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_5\text{OS}$ 468,1106, trouvé 468,1103.

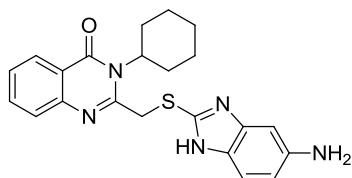
Composé 37d : 2-(((5-amino-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-3-phénylquinazolin-4(3H)-one.



Solide brun clair, m = 0,075 g, 82%, pf : 132,0-134,3°C, Pureté > 98%

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) : δ ppm 4,00 (s, 2H), 6,60 (dd, 1H, $J = 8,4, 2,1$ Hz), 6,79 (s, 1H), 7,31-7,34 (m, 3H), 7,51-7,58 (m, 4H), 7,73 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz), 7,83 (td, 1H, $J = 8,4, 1,5$ Hz), 8,29 (dd, 1H, $J = 7,8, 1,2$ Hz) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) : δ ppm 36,1, 110,3, 113,4, 117,2, 120,7, 126,5, 126,9, 127,2, 128,8 (2C), 129,4, 129,6 (2C), 134,8, 136,5, 139,6, 141,9, 144,1, 146,6, 152,2, 155,9, 161,1 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3345, 3063, 2920, 1680, 1634, 1606, 1588, 1568, 1490, 1472, 1447, 1407, 1352, 1329, 1276, 1211, 1169, 1118, 1024, 994, 806, 768, 696 ; HPLC, Tr = 1,95 min ; MS (ESI^+) : m/z 400,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{OS}$ 400,1232, trouvé 400,1231.

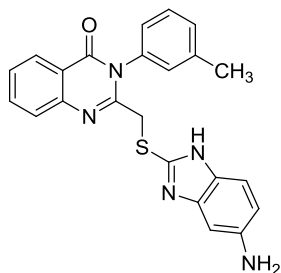
Composé 37e : 2-(((5-amino-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-3-cyclohexylquinazolin-4(3H)-one.



Solide beige, m = 0,062 g, 75%, pf : 131,9 – 136,6°C, Pureté > 98%

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) : δ ppm 1,11-1,82 (m, 8H), 2,56 (m, 2H), 4,23 (bs, 1H), 4,84 (bs, 3H), 6,47 (d, 1H, $J = 8,4, 1,6$ Hz), 6,59 (bs, 1H), 7,16 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,48 (td, 1H, $J = 8,0, 1,2$ Hz), 7,55 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,77 (td, 1H, $J = 8,4, 1,6$ Hz), 8,10 (dd, 1H, $J = 8,0, 1,2$ Hz) ; ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) : δ ppm 24,8, 25,3 (2C), 28,0 (2C), 37,1, 59,8, 110,9, 121,5, 125,9, 126,4 (2C), 126,9, 128,3, 128,7, 134,2, 136,7, 144,4, 146,0, 153,5, 161,5 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3341, 3194, 2928, 2853, 1667, 1633, 1607, 1589, 1567, 1475, 1443, 1408, 1353, 1318, 1214, 1167, 1143, 1009, 895, 806, 770, 696 ; HPLC, Tr = 2,42 min ; MS (ESI^+) : m/z 406,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{OS}$ 406,1702, trouvé 406,1699.

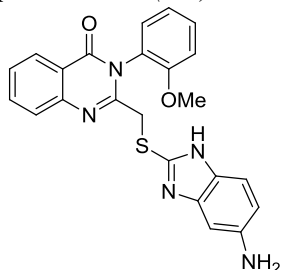
Composé 37f : 2-(((5-amino-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-3-(*m*-tolyl)quinazolin-4(3H)-one.



Solide marron, m = 0,067 g, 54%, Pureté > 98%.

^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) : δ ppm 2,34 (s, 3H), 4,23 (ABX, 2H), 6,42 (dd, 1H, $J = 8,4$, 2,0 Hz), 6,52 (bs, 1H), 7,07 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,29-7,32 (m, 3H), 7,43 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,56 (td, 1H, $J = 8,0$, 1,2 Hz), 7,66 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,86 (td, 1H, $J = 8,4$, 1,6 Hz), 8,12 (dd, 1H, $J = 8,0$, 1,2 Hz) ; ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) : δ ppm 20,7, 36,5, 96,7, 110,7, 120,6, 125,7, 126,3, 126,8 (2C), 127,0, 128,3, 129,1 (2C), 129,2, 129,9, 133,5, 134,7, 136,3, 139,0, 144,2, 146,6, 152,7, 161,1 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3349, 3210, 3059, 2918, 1674, 1633, 1598, 1583, 1567, 1472, 1407, 1350, 1285, 1213, 1163, 1110, 806, 771, 694 ; HPLC, Tr = 2,11 min ; MS (ESI^+) : m/z 414,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$ 414,1389, trouvé 414,1388.

Composé 37g : 2-(((5-amino-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-3-(2-méthoxyphényle)-quinazolin-4(3H)-one.

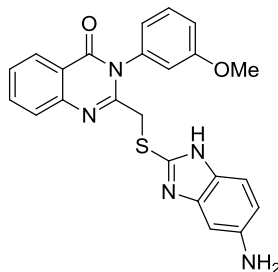


Solide beige, m = 0,092 g, 62%, pf : 143,6 – 145,6°C, Pureté > 98%.

^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) : δ ppm 3,77 (s, 3H), 4,22 (ABX, 2H), 6,42 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 6,52 (bs, 1H), 7,11 (dd, 2H, $J = 15,0$, 9,0 Hz), 7,24 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,48-7,69 (m, 4H), 7,86 (t, 1H, $J = 15,0$, 9,0 Hz), 8,12 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz) ; ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) : δ ppm 36,0, 54,8, 55,8, 110,7, 112,5 (2C), 116,3, 119,4, 120,4, 120,8, 124,4, 126,4 (2C), 126,9, 127,1, 130,0, 131,1, 134,8, 144,0, 146,6, 153,0, 154,3, 160,5 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3349, 3063, 2920, 2853, 1678, 1632, 1606, 1569, 1498, 1472, 1438, 1408, 1353, 1332, 1278, 1251, 1212, 1162, 1125, 1110, 1044, 1021, 806, 771, 753, 697 ; HPLC, Tr = 2,02 min ; MS

(ESI⁺) : m/z 430,1 [M+H]⁺; HRMS calculé pour C₂₃H₂₀N₅O₂S 430,1338, trouvé 430,1339.

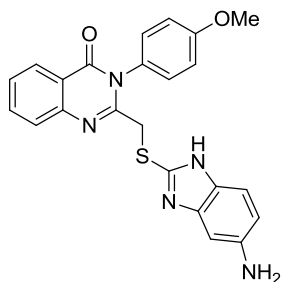
Composé 37h : 2-(((5-amino-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-3-(3-méthoxyphényl)-quinazolin-4(3H)-one.



Solide marron, m = 0,090 g, 64%, pf : 142,3 – 144,9°C, Pureté > 98%.

¹H RMN (DMSO d₆, 400 MHz) : δ ppm 3,78 (s, 3H), 4,28 (s, 2H), 6,42 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz), 6,52 (bs, 1H), 7,06 - 7,11 (td, 3H, *J* = 7,6, 2,4 Hz), 7,18 (bs, 1H), 7,46 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz) ; 7,56 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz) ; 7,66 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz) ; 7,86 (t, 1H, *J* = 8,4 Hz) ; 8,14 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz) ; ¹³C RMN (DMSO d₆, 100 MHz) : δ ppm 36,4, 55,3, 110,7, 114,5, 115,0, 120,6, 120,8, 126,3, 126,8 (2C), 127,0, 130,2, 132,0, 134,7 (2C), 137,5, 144,2, 146,6 (2C), 152,6, 159,9, 161,0 (2C) ; FT-IR : γ_{max} (cm⁻¹) : 3341, 3198, 2922, 1674, 1587, 1566, 1489, 1440, 1409, 1352, 1328, 1290, 1214, 1167, 1127, 1028, 803, 770, 694 ; HPLC, Tr = 2,08 min ; MS (ESI⁺) : m/z 430,1 [M+H]⁺; HRMS calculé pour C₂₃H₂₀N₅O₂S 430,1338, trouvé 430,1338.

Composé 37i : 2-(((5-amino-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-3-(4-méthoxyphényl)-quinazolin-4(3H)-one.

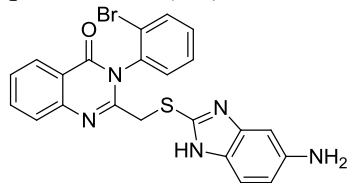


Solide beige, m = 0,128 g, 91%, pf : 144,4 – 148,8°C, Pureté > 98%.

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) : δ ppm 3,79 (s, 3H), 4,24 (bs, 2H), 6,42-6,53 (m, 2H), 7,05-7,10 (m, 3H), 7,42 (d, 2H, *J* = 8,8 Hz), 7,55 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz), 7,65 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz), 7,85 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz), 8,11 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz) ; ¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 100 MHz) : δ ppm 36,73, 55,25, 93,98, 110,49, 114,39, 114,56, 117,57, 120,59, 126,23 (2C), 126,37, 126,51, 126,78, 126,98, 128,81 (2C), 129,39, 129,86, 134,65, 146,63, 153,14, 159,42, 161,30 ; FT-IR : γ_{max} (cm⁻¹) : 3357, 3067, 3000, 2915, 1679, 1633, 1608, 1592, 1469, 1411, 1353, 1299, 1278,

1248, 1167, 1106, 1029, 829, 784, 696 ; HPLC, Tr = 1,98 min ; MS (ESI⁺): m/z 430,1 [M+H]⁺; HRMS calculé pour C₂₃H₂₀N₅OS 430,1338, trouvé 430,1330.

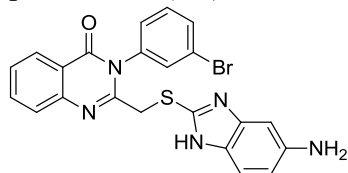
Composé 37j : 2-(((5-amino-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-3-(2-bromophényl)-quinazolin-4(3H)-one.



Solide beige, m = 0,047 g, 50%, pf : 230,5 – 231,6°C, Pureté > 98%.

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) : δ ppm 2,08 (s, 2H), 4,19 (bs, 2H), 6,41-6,49 (m, 2H), 7,07 (bs, 1H), 7,47 (td, 1H, *J* = 7,6, 1,6 Hz), 7,58 (dd, 1H, *J* = 8,4, 1,2 Hz), 7,71 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz), 7,76 (dd, 1H, *J* = 8,0, 1,6 Hz), 7,88-7,93 (m, 2H), 8,16 (dd, 1H, *J* = 8,0, 1,2 Hz) ; ¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 100 MHz) : δ ppm 54,9, 94,0, 110,5, 117,6, 120,3, 122,4, 126,5, 127,0, 127,4, 129,1, 131,1, 131,5, 133,3, 135,1, 135,4, 135,7, 136,5, 143,8, 144,5, 146,5, 151,8, 160,2 ; FT-IR : γ_{max} (cm⁻¹) : 3459, 3369, 2575, 1689, 1635, 1607, 1572, 1458, 1418, 1406, 1350, 1330, 1287, 1276, 1240, 1210, 1186, 1024, 995, 900, 825, 798, 767, 757, 718, 693 ; HPLC, Tr = 2,20 min ; MS (ESI⁺) : m/z 478,0 [M+H]⁺; HRMS calculé pour C₂₂H₁₇N₅OSBr 478,0337, trouvé 478,0335.

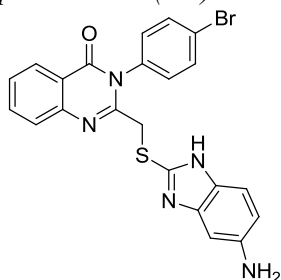
Composé 37k : 2-(((5-amino-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-3-(3-bromophényl)-quinazolin-4(3H)-one.



Solide beige, m = 0,072 g, 77%, pf : 148,7 – 152,1°C, Pureté > 98%.

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) : δ ppm 4,25 (s, 2H), 6,43 (dd, 1H, *J* = 8,4, 2,0 Hz), 6,53 (bs, 1H), 7,08 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz), 7,50-7,72 (m, 5H), 7,85-7,90 (m, 2H), 8,12 (dd, 1H, *J* = 8,0, 1,2 Hz) ; ¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 100 MHz) : δ ppm 36,4, 96,1, 110,7, 119,5, 120,5, 121,7, 126,3 (2C), 126,9, 127,1, 128,2, 131,2, 131,9 (2C), 132,3, 134,8, 137,8, 143,9, 146,6, 152,2, 158,9, 161,0 ; FT-IR : γ_{max} (cm⁻¹) : 3357, 2916, 1685, 1633, 1607, 1584, 1472, 1414, 1350, 1329, 1278, 1241, 1178, 1161, 998, 880, 799, 770, 730, 696 ; HPLC, Tr = 2,25 min ; MS (ESI⁺) : m/z 478,0 [M+H]⁺; HRMS calculé pour C₂₂H₁₇N₅OSBr 478,0337, trouvé 478,0336.

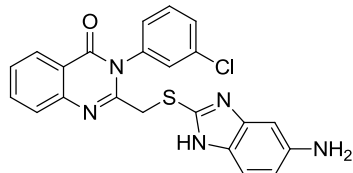
Composé 37l : 2-(((5-amino-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-3-(4-bromophényl)-quinazolin-4(3H)-one.



Solide blanc, m = 0,055 g, 59%, pf = 140,3 – 143,2°C, Pureté > 98%.

^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) : δ ppm 4,23 (s, 2H), 6,43 (dd, 1H, $J = 12,0, 4,0$ Hz), 6,53 (bs, 1H), 7,09 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,48-7,60 (m, 3H), 7,66 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz), 7,73-7,79 (m, 2H), 7,86 (td, 1H, $J = 8,0, 2,0$ Hz), 8,13 (dd, 1H, $J = 8,0, 4,0$ Hz) ; ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) : δ ppm 36,7, 96,9, 110,8, 117,1, 120,6, 122,7, 126,5, 127,0, 127,2, 127,9, 131,2 (2C), 132,6 (2C), 134,9, 135,9, 144,2, 146,7, 149,3, 152,4, 159,2, 161,1 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3656, 3349, 2917, 1682, 1633, 1595, 1469, 1412, 1350, 1334, 1279, 1148, 1065, 1010, 984, 818, 789, 695 ; HPLC, Tr = 2,21 min ; MS (ESI^+) : m/z 477,9 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{BrN}_5\text{OS}$ 478,0337, trouvé 478,0340.

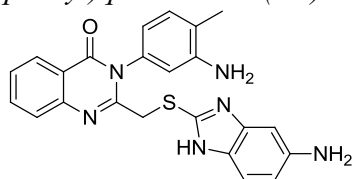
Composé 37m : 2-(((5-amino-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-3-(3-chlorophényl)-quinazolin-4(3H)-one.



Solide beige, m = 0,069 g, 74,19%, pf = 133,7 – 136,5°C, Pureté > 98%.

^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) : δ ppm 4,26 (s, 2H), 6,46 (dd, 1H, $J = 8,0, 4,0$ Hz), 6,57 (bs, 1H), 7,09 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,54-7,59 (m, 5H), 7,66 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,75 (bs, 1H), 7,87 (td, 1H, $J = 8,0, 4,0$ Hz), 8,12 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz) ; ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) : δ ppm 36,5, 94,5, 99,5, 109,8, 109,9, 111,1, 120,6, 126,5, 127,0, 127,3, 127,9, 129,2, 131,0, 131,1, 133,4, 133,6, 137,8, 137,9, 143,3, 146,7, 152,3, 161,1 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3357, 3057, 2922, 1679, 1633, 1607, 1585, 1472, 1414, 1354, 1330, 1282, 1212, 1175, 993, 775, 746, 696 ; HPLC, Tr = 2,17 min ; MS (ESI^+) : m/z 434,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{OSCl}$ 434,0842, trouvé 434,0843.

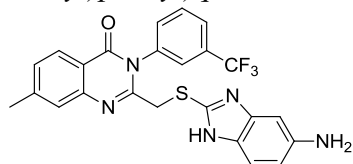
Composé 37n : 2-(((5-amino-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-3-(3-amino-4-méthylphényl)quinazolin-4(3H)-one.



Solide marron, m = 0,055 g, 63%, pf : 164,9 – 165,9°C, Pureté > 98%.

^1H RMN (CD_3OD , 400 MHz) : δ ppm 2,07 (s, 3H), 2,17-2,30 (m, 1H), 4,21 (s, 2H), 6,52 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 6,65 (s, 1H), 6,72 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 6,80 (s, 1H), 6,98 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,21 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,48 – 7,54 (m, 2H), 7,77 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz), 8,17 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz) ; ^{13}C RMN (CD_3OD , 100 MHz) : δ ppm 17,4, 54,9, 100,2, 114,7, 115,4, 116,7, 118,2, 122,1, 125,3, 128,2 (2C), 129,4 (2C), 135,6 (2C), 140,3, 144,4, 147,3 (2C), 148,5, 155,1, 164,1 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3338, 3206, 2922, 2853, 1670, 1629, 1588, 1566, 1503, 1472, 1407, 1352, 1296, 1210, 1113, 994, 800, 770, 694 ; HPLC, Tr = 1,76 min ; MS (ESI^+) : m/z 429,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{OS}$ 429,1498, trouvé 429,1500.

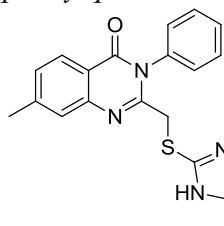
Composé 37o : 2-(((5-amino-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-7-méthyl-3-(3-(trifluorométhyl)phényl)quinazolin-4(3H)-one.



Solide marron clair, m = 0,121 g, 64,5%, pf : 143,7 – 146,9°C, Pureté > 98%.

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) : δ ppm 2,52 (s, 3H), 4,03 (s, 2H), 6,56 (d, 1H, $J = 9$ Hz), 6,74 (s, 1H), 7,24-7,72 (m, 9H), 8,10 (d, 1H, $J = 9$ Hz) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) : δ ppm 22,26, 36,03, 112,49, 118,55, 122,06, 124,77, 126,07, 126,10, 126,58, 127,07, 127,10, 127,49, 129,85, 131,07, 132,56, 132,73, 133,06, 136,82, 142,69, 146,52, 146,85 (2CH), 153,80, 161,82 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3345, 3067, 2919, 2849, 1680, 1631, 1606, 1590, 1567, 1497, 1441, 1409, 1353, 1328, 1290, 1165, 1125, 1069, 1022, 828, 803, 784, 755, 698 ; HPLC, Tr = 2,59 min ; MS (ESI^+) : m/z 482,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calculé pour $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_5\text{OS}$ 482,1262, trouvé 482,1261.

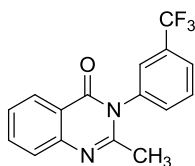
Composé 37p : 2-(((5-amino-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)thio)méthyl)-7-méthyl-3-phénylquinazolin-4(3H)-one.



Solide beige, m = 0,115 g, 82%, pf : 156,7 – 164,5°C, Pureté > 98%.

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) : δ ppm 2,55 (s, 3H), 3,98 (s, 2H), 6,58 (d, 1H, $J = 9$ Hz), 6,80 (s, 1H), 7,30-7,54 (m, 8H), 8,16 (d, 1H, $J = 9$ Hz) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) : δ ppm 22,1, 36,0, 112,5, 118,5, 118,8, 126,3, 127,3, 127,6, 128,7, 129,4, 129,6, 129,9, 130,2, 130,5, 136,3, 142,6, 146,5, 147,7, 154,8, 155,2, 161,9 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3218, 3035, 2918, 1676, 1615, 1589, 1562, 1509, 1454, 1335, 1252, 1233, 1175, 1141, 1020, 810, 761, 729, 695 ; HPLC, Tr = 2,75 min ; MS (ESI^+) : m/z 414,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Formule brute : $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{OS}$ 414,1310, trouvé 414,1312.

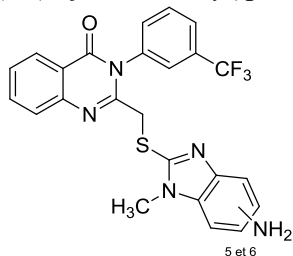
Composé 32a (produit secondaire) : 2-méthyl-3-(3-(trifluorométhyl)phényl)quinazolin-4(3H)-one.



^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) : δ ppm 2,13 (s, 3H), 7,53 (td, 1H, 9,0, 3,0 Hz), 7,68 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz), 7,82-7,92 (m, 4H), 8,00 (s, 8,10 (dd, 1H, $J = 9,0, 3,0$ Hz) ; ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) : δ 24,1, 120,4, 122,4, 125,1, 125,9, 126,3, 126,5, 126,7, 130,2, 130,8, 133,0, 134,7, 138,7, 147,3, 153,9, 161,4 ; MS (ESI^+) : m/z 305,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Formule brute : $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}$.

Synthèse du dérivé méthylé 41

Composés 41a et 41b : 2-(((5 et 6-amino-1-méthyl-benzo[d]imidazol-2-yl)sulfinyl)méthyl)-3-(3-(trifluorométhyl)phényl)quinazolin-4(3H)-one



Solide beige, m = 0,010 g, 15%, Pureté > 98%.

A une solution de 100 mg de dérivé **36a** (0,201 mmol) à 0°C, dans 5 mL de THF anhydre et sous atmosphère d'argon, sont ajoutés 1,1 éq. de *tert*-butylate de sodium (0,22 mmol, 21,2

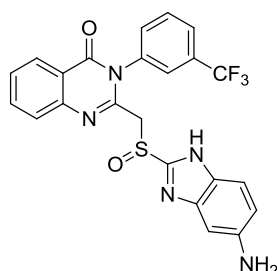
mg). La solution est agitée pendant 30 minutes à 0°C, puis 5 éq. d'iodométhane sont ajoutés (1 mmol, 142 mg, 63 μ L). La solution est agitée à température ambiante pendant 2h. A la fin de la réaction, 20 mL de saumure sont ajoutés et la solution est extraite au DCM (3 x 30 mL). Les phases organiques collectées sont séchées sur Na₂SO₄ et le solvant est évaporé. Le résidu est purifié par chromatographie sur alumine (éluant DCM/EtOH 99/1 v/v) pour donner un solide jaune correspondant à un mélange de 2 régioisomères (dérivés 5 et 6 nitrés).

Le mélange précédent est ensuite réduit dans des conditions de réduction identiques à celles décrites pour l'obtention des composés **37**. A la fin de la réaction, le brut est purifié par HPLC préparative. Les fractions contenant les produits d'intérêt sont collectées puis lyophilisées pour donner les composés **41a** et **41b**.

HPLC, Tr = 2,51 et 2,55 min ; MS (ESI⁺) : m/z 482,2 [M+H]⁺; Formule brute : C₂₄H₁₉N₅F₃OS

Synthèse du dérivé sulfoxyde **42**

Composé 42 : 2-(((5-amino-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)sulfinyl)méthyl)-3-(3-(trifluorométhyl)phényl)quinazolin-4(3H)-one.

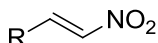


A une solution de 50 mg du composé **37a** (0,11 mmol) dans 2 mL de DCM refroidie à 0°C à l'aide d'un bain de glace, est ajoutée une solution d'un éq. de mCPBA (0,11 mmol, 19 mg) dans 0,5 mL de DCM. Le mélange est agité à 0°C pendant 1 heure. La réaction est suivie par CCM (éluant :

DCM/EtOH, 95 :5). A la fin de la réaction, le milieu réactionnel est neutralisé à l'aide d'une solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La solution est ensuite extraite avec du DCM. Les phases organiques collectées sont séchées sur du Na₂SO₄, et condensées sous-vide. Le brut obtenu est purifié par colonnes chromatographiques sur gel d'alumine. Le produit **42** est isolé avec un rendement de 19% (0,10 g).

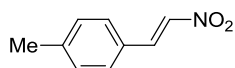
m = 0,06 g, 19% ; Pureté > 98% ; ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 4,15-4,42 (m, 2H), 6,65 (d, 2H, *J* = 9,0 Hz), 7,36-7,73 (m, 6H), 7,71 (d, 2H, *J* = 9,0 Hz), 8,21 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz) ; HPLC, Tr = 2,38 min ; MS (ESI⁺) : m/z 484,0 [M+H]⁺ ; Formule brute : C₂₃H₁₆F₃N₅O₄S

Synthèse des dérivés nitrooléfines



A un équivalent d'aldéhyde, sont ajoutés 1,3 éq. d'acétate d'ammonium et 28 éq. de nitrométhane. Le mélange est agité à 100°C pendant 1-3h (suivi réalisé par CCM). A la fin de la réaction, la solution est ramenée à TA et l'excès de nitrométhane est éliminé sous vide. Le résidu est repris avec du dichlorométhane et lavé avec de la saumure (3 fois) puis avec de l'eau distillée. Les phases organiques sont collectées, séchées sur sulfate de sodium anhydre, puis condensées. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : AcOEt/Ether de pétrole 0,5:9,5 v/v). Les nitroalcènes **50b-f** sont isolés sous la forme d'un solide, avec des rendements allant de 42 à 82%.

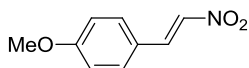
Composé 50b : (E)-1-méthyl-4-(2-nitrovinyl)benzène.



Solide jaune, m = 0,521 g, 77 %, Pureté > 96%

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) : δ ppm 2,4 (s, 3H), 7,25 (d, 2H, $J = 7,6$ Hz), 7,43 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz), 7,55 (d, 1H, $J = 14,0$ Hz), 7,96 (d, 1H, $J = 13,6$ Hz) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) : δ ppm 21,6, 127,2, 129,2, 130,1, 136,3, 139,1, 143,1 ; HPLC, Tr = 3,3 min ; Formule brute : $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_2$.

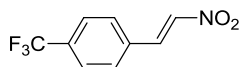
Composé 50c : (E)-1-méthoxy-4-(2-nitrovinyl)benzène.



Solide jaune, m = 0,540 g, 82 %, Pureté : >96%

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) : δ ppm 3,87 (s, 3H), 6,93 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz), 7,49 (d, 2H, $J = 3,6$ Hz), 7,51 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,95 (d, 1H, $J = 13,6$ Hz) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) : δ ppm 55,5, 114,9, 122,5, 131,1, 135,0, 139,0, 162,9 ; HPLC, Tr = 3,01 min ; MS (ESI^+) : m/z 180,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Formule brute : $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_3$.

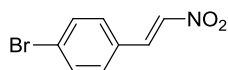
Composé 50d : (E)-1-(2-nitrovinyl)-4-(trifluorométhyl)benzène.



Solide beige, m = 0,262 g, 42 %, Pureté > 97%

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) : δ ppm 7,61 (d, 1H, $J = 13,8$ Hz), 7,67 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz), 7,72 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz), 8,01 (d, 1H, $J = 13,8$ Hz) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) : δ ppm 126,30, 126,35, 129,23 (2C), 129,62 (2C), 132,30, 137,10, 138,82 ; HPLC, Tr = 3,3 min ; Formule brute : $\text{C}_9\text{H}_6\text{F}_3\text{NO}_2$.

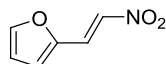
Composé 50e : (E)-1-(2-nitrovinyl)-4-bromobenzène.



Solide violacé, m = 0,698 g, 57 %, Pureté > 97%.

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) : δ ppm 7,42 (d, 2H, $J = 9,0$ Hz), 7,54 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz), 7,58-7,62 (m, 2H), 7,93 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) : δ ppm 126,9, 130,5 (2C), 131,5, 132,9 (2C), 137,7, 137,9 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3105, 3035, 2289, 1633, 1587, 1563, 1516, 1499, 1486, 1402, 1335, 1259, 1183, 1072, 1009, 965, 940, 809, 742 ; HPLC, Tr = 3,4 min ; Formule brute : $\text{C}_8\text{H}_6\text{BrNO}_2$.

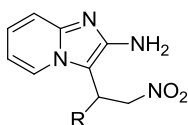
Composé 50f : (E)-1-(2-nitrovinyl)-furan.



Solide jaune, m = 0,422 g, 58 %, Pureté > 97%

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) : δ ppm 6,57 (dd, 1H, $J = 6,0, 3,0$ Hz), 6,88 (d, 1H, $J = 3,0$ Hz), 7,50 (d, 1H, $J = 15,0$ Hz), 7,59 (dd, 1H, $J = 6,0, 3,0$ Hz), 7,77 (d, 1H, $J = 15,0$ Hz) ; HPLC, Tr = 2,41 min ; Formule brute : $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_3$.

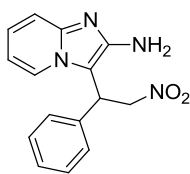
Synthèse des produits d'addition de Michael sur la 2-aminoimidazopyridine



A une solution d'un équivalent de 2-aminoIP **4** dans du DCM (10 mL) refroidie à 0°C , est ajouté 0,5 équivalent de (E)-nitroalcène et le mélange est agité à 0°C pendant 1 heure.

A la fin de la réaction, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice, avec comme éluant un mélange d'acétate d'éthyle et de *n*-hexane (7/3, v/v). Les composés **51a-f** sont isolés avec des rendements variant entre 67 et 95%.

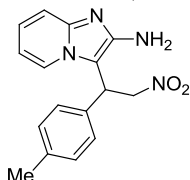
Composé 51a : 3-(2-nitro-1-phényléthyl)imidazo[1,2-a]pyridin-2-amine.



Solide orange, 95%, pf : 81,5-84,5°C, Pureté > 98%.

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) : δ ppm 3,89 (bs, 2H), 5,05 (d, 2H, $J = 7,6$ Hz), 5,17 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz), 6,98 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,18-7,28 (m, 6H), 7,64 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) : δ ppm 38,8, 75,5, 101,4, 111,8, 115,0, 121,7, 123,5, 127,0, 128,0, 129,3, 135,6, 142,3, 148,0 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3326, 3181, 2987, 2922, 1728, 1633, 1550 ; HPLC, Tr = 2,01 min ; MS (ESI^+) : m/z 283,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Formule brute : $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$.

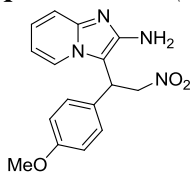
Composé 51b : 3-(2-nitro-1-(p-tolyl)éthyl)imidazo[1,2-a]pyridin-2-amine.



Solide orange, 85%, pf : 60,3-64,0°C, Pureté > 98%.

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) : δ ppm 2,30 (s, 3H), 5,07 (d, 1H, $J = 1,5$ Hz), 5,09 (s, 1H), 5,20 (t, 1H, $J = 6,3$ Hz), 6,70 (dt, 1H, $J = 5,1, 0,9$ Hz), 7,08 (m, 1H), 7,14 (m, 4H), δ 7,35 (td, 1H, $J = 6,0, 0,9$ Hz), 7,73 (d, 1H, $J = 5,4$ Hz) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) : δ ppm 21,0, 38,7, 75,6, 101,6, 111,9, 115,3, 121,8, 123,5, 127,0, 130,1, 132,5, 138,1, 142,5, 148,1 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3319, 3180, 2921, 2852, 1632, 1548 ; HPLC, Tr = 1,12 min ; MS (ESI^+) : m/z 297,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Formule brute : $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2$.

Composé 51c : 3-(1-(4-méthoxyphényl)-2-nitroéthyl)imidazo[1,2-a]pyridin-2-amine.

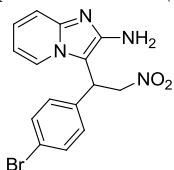


Solide orange, 90%, pf : 56,2-58,4°C, Pureté > 98%.

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) : δ ppm 3,76 (s, 3H), 5,05 (d, 1H, $J = 1,2$ Hz), 5,08 (s, 1H), 5,18 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz), 6,67 (dt, 1H, $J = 6,6, 1,2$ Hz), 6,85 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz), 7,14 (dt, 4H, $J = 7,2, 1,2$ Hz), 7,17 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz), 7,71 (d, 1H, $J = 6,6$ Hz) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) : δ ppm 38,7, 55,5, 76,1, 102,0, 112,1, 115,0 (2C), 115,5, 122,0, 123,6, 127,6, 128,5 (2C), 142,7, 148,3, 159,6 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3328, 3182, 2923, 2851, 1609, 1547, 1510 ;

HPLC, Tr = 1,05 min ; MS (ESI⁺) : m/z 313,0 [M+H]⁺ ; Formule brute : C₁₆H₁₆N₄O₃.

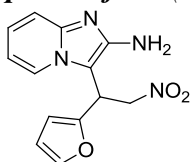
Composé 51e : 3-(1-(4-bromophényl)-2-nitroéthyl)imidazo[1,2-a]pyridin-2-amine.



Solide brun, m = 0,190 g, 96%, Pureté > 98%.

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 3,68 (bs, 2H), 5,15 (m, 2H), 6,62 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz), 6,73 (t, 1H, *J* = 9,0 Hz), 7,10 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz), 7,15 (d, 2H, *J* = 9,0 Hz), 7,38 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz), 7,48 (d, 2H, *J* = 9,0 Hz), 7,68 (d, 1H, *J* = 6,0 Hz) ; HPLC, Tr = 2,38 min ; MS (ESI⁺) : m/z 361,0 [M+H]⁺ ; Formule brute : C₁₅H₁₃BrN₄O₂.

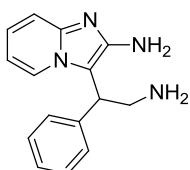
Composé 51f : 3-(1-(furan-2-yl)-2-nitroéthyl)imidazo[1,2-a]pyridin-2-amine.



Solide orange, 76%, pf : 79,2-82,7°C, Pureté >98%.

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) : δ ppm 4,94 (dd, 1H, *J* = 13,2, 7,8 Hz), 5,12 (dd, 1H, *J* = 13,2, 7,2 Hz), 5,35 (t, 1H, *J* = 7,8 Hz), 6,23 (d, 2H, *J* = 3,3 Hz), 6,37 (m, 2H), 6,78 (dt, 1H, *J* = 0,9, 6,9 Hz), 7,12 (dd, 1H, *J* = 6,9, 0,9 Hz), 7,37 (d, 2H, *J* = 9,0 Hz), 7,42 (d, 1H, *J* = 1,2 Hz), 7,85 (d, 1H, *J* = 6,9 Hz) ; ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) : δ ppm 29,7, 33,4, 73,7, 102,3, 108,0, 110,9, 112,0, 115,4, 121,9, 123,6, 138,0, 143,0, 148,5 ; FT-IR : γ_{max} (cm⁻¹) : 3323, 3200, 2925, 2851, 1609, 1548, 1509 ; HPLC, Tr = 0,88 min ; MS (ESI⁺) : m/z 273,0 [M+H]⁺ ; Formule brute : C₁₃H₁₂N₄O₃.

Synthèse de la diamine 54a

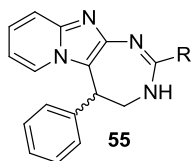


A une suspension de 200 mg de composé **51a** (0,71mmol) et de 177 mg d'acétate de Nickel Ni(OAc)₂·4H₂O (1 éq, 0,7 mmol) dans du méthanol (6 mL) refroidie à 0°C, sont ajoutés très lentement, 134 mg de NaBH₄ (5 éq, 3,55 mmol).

Le mélange est agité à 0°C pendant 45 minutes ; la réaction est suivie par HPLC. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution aqueuse saturée de NH₄Cl (10 mL) et le milieu réactionnel est extrait au DCM (3 x 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, et le solvant est éliminé par évaporation sous pression réduite. Le composé brut

54a obtenu (173 mg) est utilisé sans purification pour l'étape suivante.

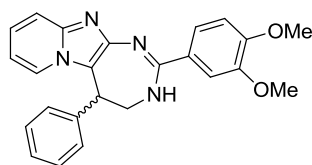
Synthèse des composés **55**



A une solution d'un équivalent du composé **54a** et d'une quantité équimolaire de 3,4-diméthoxybenzaldéhyde ou de 4-bromobenzaldéhyde dans 15 mL de tBuOH, sont ajoutés 3

éq. de diiode (I_2) et 3 éq. de carbonate de potassium (K_2CO_3). Le mélange est agité à 70°C toute une nuit. L'avancement de la réaction est suivi par HPLC. A la fin de la réaction, le milieu réactionnel est coévaporé avec du DCM pour éliminer le tBuOH. Le résidu est ensuite repris avec du $CHCl_3$, lavé avec une solution aqueuse de thiosulfate de sodium à 10% (3 x 25mL). Les phases organiques sont collectées, séchées sur $MgSO_4$ et le solvant est éliminé sous-vide. Les composés **55a** et **55b** sont isolés, après purification par chromatographie sur colonne d'alumine, avec des rendements de 15 et 24% respectivement.

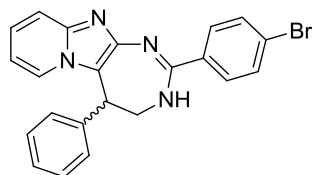
Composé 55a : 2-(3,4-diméthoxyphényl)-5-phényl-4,5-dihydro-3H-pyrido[1',2':1,2]-imidazo[4,5-d][1,3]diazépine.



Solide marron, 15%, Pureté > 98%.

1H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) : δ ppm 3,73 (m, 2H), 3,74 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 4,57 (bs, 1H), 6,50 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 6,67 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 6,98 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,07-7,20 (m, 5H), 7,28 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,39 (t, 2H, $J = 8,0$ Hz), 7,70 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN ($CDCl_3$, 100 MHz) : δ ppm 44,3, 49,2, 56,0, 56,1, 110,1, 111,7 (2C), 116,6, 120,1, 122,7, 123,5, 127,4, 128,2 (2C), 128,8 (2C), 129,3, 129,7, 141,4, 142,3, 148,5, 148,9, 151,3, 156,8 ; HPLC, Tr = 2,33 min ; MS (ESI^+) : m/z 399,1 $[M+H]^+$; Formule brute : $C_{24}H_{22}N_4O_3$.

Composé 55b : 2-(4-bromophényl)-5-phényl-4,5-dihydro-3H-pyrido[1',2':1,2]imidazo[4,5-d][1,3]diazépine.

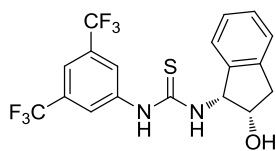


Solide jaune, 24%, Pureté > 98%.

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) : δ ppm 3,79 (ABX, 2H), 4,59 (m, 2H), 6,58 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,03 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,08 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz), 7,14-7,20 (m, 4H), 7,35-7,38 (m, 2H), 7,44 (t, 2H, $J = 8,0$ Hz), 7,73 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) : δ ppm 44,2, 49,2, 112,1, 116,5, 121,1, 122,7, 124,1, 125,3, 127,5, 128,1 (2C), 128,7, 128,9 (2C), 129,5 (2C), 131,4 (2C), 135,3, 141,0, 142,1, 156,0 ; HPLC, Tr = 2,72 min ; MS (ESI^+) : m/z 418,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 420,1 $[\text{M}+2+\text{H}]^+$; Formule brute : $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{BrN}_4$.

Procédures de synthèse des catalyseurs

Synthèse du catalyseur Cat.1 : *1-(3,5-bis(trifluorométhyl)phényl)-3-((1R,2S)-2-hydroxy-2,3-dihydro-1H-indén-1-yl)thiourée*.

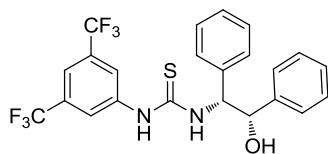


A une solution de 0,5 g d'isocyanate de 3,5-bis(trifluorométhyl)phényle (1,84 mmol) dans 5 mL de DCM, est ajouté 0,275 g de (*1S*, *2R*)-(-)-cis-1- amino-2-indanol (1 éq., 1,84

mmol). Le mélange est agité à TA pendant 4H (suivi réactionnel par HPLC). A la fin de la réaction, le solvant est éliminé par évaporation sous pression réduite. Le composé **Cat.1** est isolé quantitativement sous forme d'un solide blanc cristallin.

Solide blanc cristallin, m = 0,763 g, Pureté > 98% ; HPLC, Tr = 3,81 min ; MS (ESI^+) : m/z 421,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Formule brute : $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{F}_6\text{N}_2\text{OS}$. Données structurales identiques à la littérature.³⁰⁶

Synthèse du catalyseur Cat.2 : *1-(3,5-bis(trifluorométhyl)phényl)-3-((1R,2S)-2-hydroxy-1,2-diphényléthyl)thiourée*.

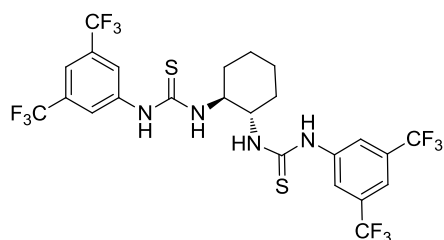


A une solution de 0,5 g d'isocyanate de 3,5-bis(trifluorométhyl)phényle (1,84 mmol) dans 5 mL de DCM, est ajouté 0,393 g de (*1S*, *2R*)-2-amino-1,2- diphényl-

éthanol (1 éq., 1,84 mmol). Le mélange est agité à TA pendant 4h (suivi réactionnel par HPLC). A la fin de la réaction, le solvant est éliminé par évaporation sous pression réduite. Le composé **Cat.2** est isolé quantitativement sous forme d'un solide blanc cristallin.

Solide blanc cristallin, m = 0,845 g, Pureté > 98% ; HPLC, Tr = 4,11 min ; MS (ESI+) : m/z 485,0 [M+H]⁺ ; Formule brute : C₂₃H₁₈F₆N₂OS. Données structurales identiques à la littérature.³⁰⁶

Synthèse du catalyseur Cat.3 : 1,1'-((1S,2S)-cyclohexane-1,2-diyl)bis(3-(3,5-bis(trifluorométhyl)phényl)thiourée).



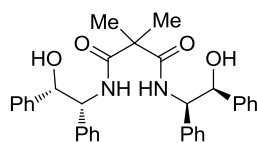
A une solution de 0,5 g d'isocyanate de 3,5-bis(trifluorométhyl)phényle (1,844 mmol) dans 5 mL de DCM, est ajouté 0,105 g de *trans*-cyclohexane-1,2-diamine (0,5 éq., 0,922 mmol). Le mélange est agité à

TA pendant 4h (suivi réactionnel par HPLC). A la fin de la réaction, le solvant est éliminé par évaporation sous pression réduite. Le composé Cat.3 est isolé sous forme d'un solide blanc cristallin.

Solide blanc cristallin, m = 0,390 g, Pureté > 98% ; HPLC, Tr = 4,5 min ; MS (ESI+) : m/z 656,9 [M+H]⁺ ; Formule brute : C₂₄H₂₀F₁₂N₄S₂. Données structurales identiques à la littérature.³⁰⁶

Synthèse du catalyseur Cat. 5

Synthèse du dérivé bis-amide 74 : N1,N3-bis((1R,2S)-2-hydroxy-1,2-diphényléthyl)-2,2-diméthylmalonamide.



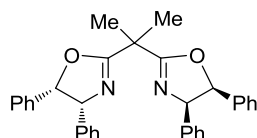
A une solution de 0,250 g de (1S, 2R)-2-amino-1,2-diphényléthanol dans 10 mL de DCM (1,172 mmol), est ajouté 407 µL de triéthylamine (2,5 éq., 2,93 mmol).

La solution est refroidie à une température en dessous de 0°C. Ensuite, 77 µL d'une solution de dichlorure de 2,2-diméthylmalonyle dans 2 mL de DCM (0,5 éq., 0,586 mmol), sont ajoutés goutte-à-goutte au mélange, sous atmosphère inerte en maintenant la température en dessous de 0°C. Le mélange est agité à TA pendant une nuit. A la fin de la réaction, le milieu réactionnel est décomposé avec de l'eau, et les phases sont séparées. La phase aqueuse est extraite au DCM (3 x 15 mL). Les phases organiques collectées sont séchées sur MgSO₄, et le solvant est éliminé par évaporation. Le brut obtenu est recristallisé dans

l'acétate d'éthyle pour donner le dérivé bis-amide **74** avec un rendement de 88%.

Solide blanc cristallin, m = 1,078 g, 88%, Pureté > 98% ; HPLC, Tr = 3,28 min ; MS (ESI+) : m/z 523,0 [M+H]⁺ ; Formule brute : C₃₃H₃₄N₂O₄. Données structurales identiques à la littérature.³⁰⁸

Synthèse du Ligand 76 : (4R,4'R,5S,5'S)-2,2'-(propane-2,2-diyl)bis(4,5-diphényl-4,5-dihydrooxazole).

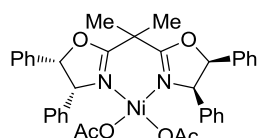


A une suspension de 0,5 g du composé bis-amide **74** (0,96 mmol) dans 48 mL de xylènes, est ajouté 0,178 g de molybdate d'ammonium tétrahydraté (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O

(0,15 éq. soit 1 éq. de Mo, 0,14 mmol). Le mélange est agité au reflux de xylènes (température maintenue à 170°C), à l'aide d'un appareil de Dean-Stark. La réaction est agitée pendant 21h. A la fin de la réaction, le solvant est éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif équipé d'une pompe à palettes. Le produit brut est recristallisé dans le *n*-heptane pour donner le ligand **76** sous forme d'un solide blanc cristallin avec un rendement de 30%.

Solide blanc cristallin, m = 0,138 g, 30%, Pureté > 98% ; HPLC, Tr = 3,27 min ; MS (ESI+) : m/z 487,0 [M+H]⁺ ; Formule brute : C₃₃H₃₀N₂O₂. Données structurales identiques à la littérature.³⁰⁸

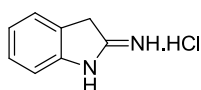
Obtention du catalyseur Cat. 5



Ce complexe est préparé au moment de l'addition de Michael. A une suspension de 0,007 g d'acétate de nickel tétrahydraté Ni(OAc)₂·4H₂O (MM = 248,84 g/mol, 5% mol

par rapport au précurseur stable **3**, de la 2-amino-IP **4**) dans du DCM (1 mL), est ajouté 0,015 g de ligand **76** (MM = 486 g/mol, 0,030 mmol). Le mélange est agité à 0°C pendant 10 min, et la solution obtenue est immédiatement engagée dans la réaction d'addition de nitro-Michael.

Synthèse du composé 89 : chlorhydrate d'indolin-2-imine.

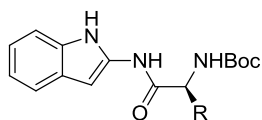


A une solution d'un gramme de 2-nitrophénylacétonitrile (6,2 mmol) dans 30 mL d'éthanol, sont ajoutées quelques

gouttes d'acide chlorhydrique 37%, et une quantité catalytique de palladium adsorbé sur charbon (1 à 2 pointes de spatules). Le mélange est agité à TA sous flux continu d'hydrogène pendant 3h (suivi réactionnel réalisé par HPLC). La solution est filtrée sur célite. Le filtrat jaune est ensuite acidifié avec HCl 37% jusqu'à pH = 2 et agité à reflux d'éthanol toute une nuit (la solution vire du jaune au rouge). Le solvant est évaporé et le résidu est repris avec de l'éther diéthylique. Le composé **89** est obtenu après filtration sur fritté sous la forme d'un précipité rouge brique avec un rendement de 85%.

Solide bleu-verdâtre, m = 0,883 g, 85% , Pureté > 98% ; ^1H RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz) : δ ppm 4,18 (s, 2H), 7,13 (t, 1H, $J = 9,0$ Hz), 7,22 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz), 7,30 (t, 1H, $J = 9,0$ Hz), 7,42 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz), 7,96 (s, 1H), 10,20 (s, 1H), 12,43 (s, 1H) ; ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 75 MHz) : δ ppm 35,93, 111,76, 123,62, 124,58, 126,50, 127,94, 142,78, 170,98 ; FT-IR : γ_{max} (cm^{-1}) : 3299, 2928, 2851, 2654, 2559, 1680, 1600, 1445, 1241, 1203, 1172, 1067, 969, 935, 753, 701 ; HPLC, Tr = 1,27 min ; MS (ESI+) : m/z 133,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Formule brute : $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_2\text{Cl}$.

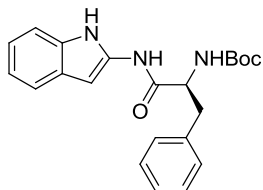
Synthèse des composés *N*-acylés **90**



Un équivalent du composé **89** est solubilisé dans du DCM et la solution est refroidie à 0°C à l'aide d'un bain de glace. Ensuite, 1,1 équivalent de Boc-AA-OH, EDCI, HOBT et 3,5 équivalents de triéthylamine sont ajoutés.

Le mélange est agité à température ambiante toute une nuit (suivi réactionnel réalisé par CCM). A la fin de la réaction, la solution est lavée avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium, séchée sur du sulfate de sodium anhydre, et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié par colonne chromatographique de gel de silice (éluant : AcOEt/*n*-Hexane 1:9 v/v). Les composés **90a** et **90b** sont isolés avec des rendements de 48%.

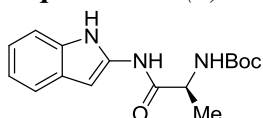
Composé 90a : (S)-tert-butyl (1-((1H-indol-2-yl)amino)-1-oxo-3-phénylpropan-2-yl)carbamate.



Solide violacé, m = 0,095 g, 48 %, Pureté > 98%.

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) : δ ppm 1,46 (s, 9H), 3,10 (dd, 1H, $J = 12,8, 6,4$ Hz), 3,22 (dd, 1H, $J = 13,6, 6,4$ Hz), 4,64 (bs, 1H), 5,28 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz), 5,83 (s, 1H), 7,11-7,34 (m, 8H), 7,46 (d, 1H, $J = 5,6$ Hz), 9,14 (bs, 1H), 10,18 (s, 1H) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) : δ ppm 28,2, 38,0, 56,2, 81,2, 86,5, 110,8, 119,2, 120,1, 120,8, 126,6, 127,2, 128,8, 129,2, 132,4, 134,3, 136,0, 156,0, 170,0 ; HPLC, Tr = 3,58 min ; MS (ESI+) : m/z 380,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Formule brute : $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$.

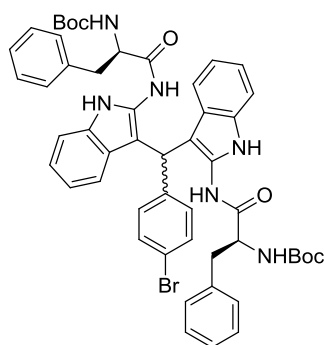
Composé 90b : (S)-tert-butyl (1-((1H-indol-2-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)carbamate.



Solide violacé, m = 0,095 g, 48 %, Pureté > 98%.

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) : δ ppm 1,46 (d, 3H, $J = 8,0$ Hz), 1,49 (s, 9H), 4,39 (s, 1H), 5,12 (s, 1H), 5,90 (m, 1H), 7,00-7,11 (m, 2H), 7,23 (bs, 1H), 7,43-7,47 (m, 1H), 9,29 (bs, 1H), 10,20 (bs, 1H) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) : δ ppm 28,4, 28,5 (3C), 110,9, 111,0, 118,4, 119,4, 120,1, 120,3, 120,9, 121,7, 121,9, 125,2, 135,0, 152,8 ; HPLC, Tr = 3,06 min ; MS (ESI+) : m/z 304,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Formule brute : $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3$.

Composé 108a

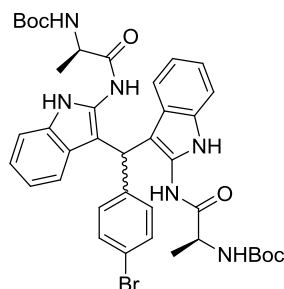


Solide violacé, m = 0,141 g, 98 %, Pureté > 98%.

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) : δ ppm 1,31 (s, 18H), 2,44 (m, 1H), 2,85-2,97 (m, 3H), 4,15 (m, 1H), 4,29 (m, 1H), 5,80 (s, 1H), 6,96-7,05 (m, 10H), 7,12-7,24 (m, 10H), 7,35 (m, 4H), 7,81 (bs, 1H), 8,12 (bs, 1H), 10,20 (s, 1H), 10,45 (s, 1H) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) : δ ppm

28,3, 37,3, 56,4, 56,6, 80,8, 81,1, 111,2, 111,5, 118,7, 118,9, 120,6, 120,7, 121,7, 121,8, 126,3, 127,3, 128,8, 128,9, 129,1, 129,2, 129,3, 130,6, 132,1, 136,1, 141,0, 155,3, 155,7, 170,6 ; HPLC, Tr = 4,96 min ; MS (ESI+) : m/z 924 [M+H]⁺ ; Formule brute : C₅₁H₅₃BrN₆O₆.

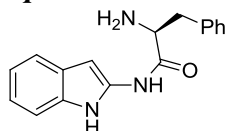
Composé 108b



Solide violacé, m = 0,062 g, 64 %, Pureté > 98%.

¹H RMN (DMSO *d*₆, 400 MHz) : δ ppm 1,06 (d, 3H, *J* = 7,0 Hz), 1,16 (d, 3H, *J* = 7,0 Hz), 1,34 (s, 9H), 1,37 (s, 9H), 4,05 (m, 2H), 5,85 (s, 1H), 6,38 (bs, 2H), 6,67 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz), 6,72 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz), 6,78 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz), 6,95 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz), 7,16 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz), 7,40 (m, 4H), 9,39 (d, 2H, *J* = 9,2 Hz), 10,92 (s, 2H) ; ¹³C RMN (DMSO *d*₆, 100 MHz) : δ ppm 17,2, 17,3, 27,6, 27,7, 36,4, 49,7, 49,8, 77,9, 78,0, 110,8, 110,9, 118,2, 118,3, 118,5, 119,6, 119,7, 125,7, 125,8, 130,0, 130,2, 130,3, 132,6, 132,7, 142,3, 154,4, 171,8, 172,1 ; HPLC, Tr = 4,43 min ; MS (ESI+) : m/z 772 [M+H]⁺ ; Formule brute : C₃₉H₄₅BrN₆O₆.

Composé 110a : intermédiaire amine

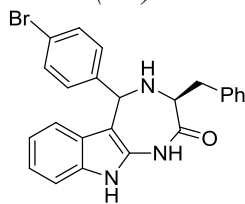


Une solution de 0,218 g du composé **90a** ($5,75 \times 10^{-4}$ mol, MM = 379 g/mol) dans 5 mL d'un mélange de DCM/TFA (1 :1, v/v) est agité à TA pendant 30 min. A la fin de la réaction, le solvant est

évaporé à sec, le brut réactionnel est repris dans l'acétonitrile puis évaporé à sec (opération répétée deux fois). Ensuite, 5 mL d'eau distillée sont ajoutés au résidu, et la solution est basifiée avec 2 mL de NH₄OH_{aq} 35%. Le produit **110a** est isolé sans purification supplémentaire, après extraction au DCM et évaporation du solvant.

Solide verdâtre, m = 0,155 g, 95 %, Pureté > 98%. HPLC, Tr = 2,36 min ; MS (ESI+) : m/z 271,0 [M+H]⁺ ; Formule brute : C₁₇H₁₇N₃O.

Composé 111a : (3S)-3-benzyl-5-(4-bromophényl)-3,4,5,10-tétrahydro[1,4]diazépino[5,6-b]indol-2(1H)-one.



A une solution de 0,100 g du composé **110a** (3,5 μmol) dans 10 mL de THF anhydre, est ajouté sous atmosphère inerte 0,066 g de 4-bromobenzaldéhyde (1 éq., 3,5 μmol). Le mélange est agité à 40°C pendant une nuit. A la fin de la réaction, le solvant est

évapouré et le produit brut est purifié par colonne chromatographique (éluant : DCM puis DCM/AcOEt, 1:1, v/v). Le composé **111a** est isolé sous la forme d'un solide jaune avec un rendement de 20%.

Solide violacé, m = 0,030 g, 20 %, Pureté > 98%. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) : δ ppm 2,85 (dd, 1H, $J = 13,6, 11,5$ Hz), 3,45 (dd, 1H, $J = 13,6, 3,8$ Hz), 3,85 (m, 1H), 5,00 (s, 1H), 6,65 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz), 6,86 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz), 6,95 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz), 7,03 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,15 (d, 1H, 8,0 Hz), 7,26-7,37 (m, 8H), 9,0 (s, 1H, 9,71 (s, 1H) ; ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) : δ ppm 29,9, 36,7, 60,7, 62,5, 102,2, 110,6, 118,9, 120,1, 121,8, 121,9, 126,8, 127,2, 129,0, 129,4, 130,1, 130,8, 131,8, 133,2, 137,8, 141,4, 175,6 ; HPLC, Tr = 2,44 min ; MS (ESI+) : m/z 445 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Formule brute : $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{BrN}_3\text{O}$.

VII.2. Étude biochimique et de la cytotoxicité

Tous les tests enzymatiques, les études de cytotoxicité des composés ainsi que les expériences de docking des meilleurs inhibiteurs, ont été réalisés au laboratoire de Biologie Cellulaire du Vieillissement, Groupe Enzymologie Moléculaire et Fonctionnelle de l'Université Pierre et Marie Curie. Les enzymes recombinantes KLK5, KLK7, KLK8 et KLK14, ont été fournies par R & D Systems, France. Le DMSO et les réactifs des tests cellulaires ont été fournis par la firme SIGMA-ALDRICH®.

Les substrats portent un groupe fluorescent AMC (amino-méthyle-coumarine), et ont été fournis par Bachem, Weil am Rhein, Allemagne. Le substrat utilisé pour la KLK7, est le Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC. Les activités enzymatiques, et les absorbances du test de viabilité cellulaire au XTT (2,3-Bis-(2-Méthoxy-4-Nitro-5-Sulfophényl)-2H-Tétrazolium-5-Carboxanilide), ont été mesurées à l'aide d'un spectrofluorimètre lecteur de plaques multipuits BMG FLUOStar, piloté par le logiciel Biolise® et équipé d'un dispositif de thermostation par effet Pelletier. Les traitements mathématiques et statistiques des données cinétiques ont été effectués à l'aide du logiciel Kaleidagraph®.

VII.2.1. Enzymes et tests d'inhibition de l'activité enzymatique

Les activités enzymatiques de KLK5, KLK7, KLK8 et KLK14, ont été déterminées en utilisant des plaques de 96 puits, et le suivi a été réalisé à l'aide d'un appareil BMG Fluostar. L'hydrolyse du substrat fluorogène a été mesurée pendant 15 min à 37°C, en présence d'une enzyme non traitée (témoin) et d'une enzyme traitée avec un composé à tester. Cette mesure a consisté à détecter la libération du groupe fluorescent AMC, à une longueur d'onde d'excitation (λ_{exc}) de 360 nm, et une longueur d'onde d'émission (λ_{em}) de 460 nm.

Les substrats fluorogènes et les composés à tester ont été préalablement solubilisés dans le DMSO, et conservés à une température de -20°C. Pour les mesures de fluorescence, les mélanges réactionnels ont été resuspendus dans les plaques de 96 puits. La concentration finale du solvant est maintenue constante à 2 % (v/v). La composition des tampons d'activité à pH 8,0 était : 50 mM Tris-HCl, Tween 20 0,01 % (v/v) et 150 mM NaCl pour KLK5, 1M NaCl pour KLK7 et KLK14. Les concentrations finales étaient 0,6 nM (KLK5), 100 μ M (Boc-Val-Pro-Arg-AMC) ; 7,6 nM (KLK7), 40 μ M (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC) ; 1,0 nM (KLK8), 100 μ M (Boc-Val-Pro-Arg-AMC) ; 0,2 nM (KLK14), 10 μ M (Boc-Val-Pro-Arg-AMC). Les composés ont été testés en triplicat à différentes concentrations, afin de détecter leur activité inhibitrice. L'enzyme et les inhibiteurs ont été incubés pendant 15 min, avant la détermination de l'activité enzymatique. Les vitesses initiales (V_0) déterminées dans les conditions expérimentales, ont été considérées comme correspondantes à 100% de l'activité de la protéase. Les vitesses initiales (V_i) inférieures à 100% en présence d'un composé testé, ont été considérées comme étant des inhibitions. L'activité inhibitrice des composés a été exprimée en IC_{50} (concentrations d'inhibiteur donnant 50% d'inhibition). Les valeurs des IC_{50} ont été calculées en ajustant les données expérimentales à l'équation suivante : % Inhibition = $100 \times (1 - V_i/V_0) = 100 [I]_0/(IC_{50} + [I]_0)$, ou à l'équation, % Inhibition = $100 [I]_0^{n_H}/(IC_{50}^{n_H} + [I]_0^{n_H})$ avec n_H = nombre de Hill.

VII.2.2. Mécanismes d'inhibition

La réversibilité a été analysée en diluant les mélanges réactionnels (dilution par un facteur de 40) après 15 et 60 min de préincubation de l'enzyme avec l'inhibiteur. Des aliquots de mélanges réactionnels (2,5 μ L) ont été additionnés à 97,5 μ L de tampon contenant le substrat fluorogène (conditions expérimentales identiques au protocole utilisé en routine pour

une enzyme donnée). Le mécanisme d'inhibition a été déterminé en variant les concentrations en substrat et en inhibiteur, et en utilisant la représentation graphique classique de Lineweaver-Burk.

VII.2.3. Expériences de docking moléculaire

L'étude de docking du composé JMV5046 a été réalisée en utilisant le logiciel de docking *Molegro virtual docker* version 5.5.0. Les structures d'enzyme utilisées pour le docking ont été obtenues à partir du fichier PDB 2QXH, correspondant à la KLK7 complexée avec l'inhibiteur succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe chlorométhylcétone (Suc-AAPF-CMK). Les hétéroatomes et les ligands ont été retirés des structures cristallines, et des atomes d'hydrogène ont été ajoutés. La fonction de notation Moldock Score et l'algorithme de recherche Moldock SE ont été utilisés. La résolution de la grille pour l'estimation de l'affinité de liaison était de 0,3 Å avec un rayon de 15 Å, autour des résidus de la triade catalytique. Quinze essais ont été lancés, et jusqu'à 50 (maximum) poses ont été ensuite analysées. Les figures ont été réalisées avec le logiciel Pymol (DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA).

VII.2.4. Culture cellulaire et test de cytotoxicité

Les cellules PC-3 et SW-620 ont été gracieusement fournies par le Dr Dalila Darmoul (INSERM U976, Université Paris Diderot, et Sorbonne Paris Cité). Les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits, à raison de 5000 cellules par puits, dans 100 µL de milieu / puits constitué d'un milieu DMEM, complété avec du sérum bovin fœtal (10%), de la pénicilline (100 µg / mL) et de la streptomycine (100 µg / mL) à 37°C et 5% de CO₂. 20h après l'ensemencement des cellules, 1µL de différentes concentrations de chaque inhibiteur, préalablement dissous dans du DMSO, ont été ajoutés aux puits. Un volume équivalent de DMSO a été utilisé comme témoin, pour une concentration finale en DMSO de 1% (v/v). Pour chaque condition, au moins trois puits ont été mesurés. 48 à 72h après l'incubation, le milieu de culture est éliminé et remplacé par 100 µL de nouveau milieu / puits (sans rouge de phénol), additionné de XTT (0,3 mg/mL) et de PMS (8,3 µM). Après 3 h d'incubation, l'absorbance est lue à 485 nm. Le test XTT est basé sur l'activité de la déshydrogénase mitochondriale. La viabilité cellulaire relative a été exprimée en pourcentage, par rapport à la viabilité des cellules traitées uniquement avec du DMSO.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ¹ Nelson D. L. and *al.* *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th Ed. Freeman W. H., (2004).
- ² Enzyme nomenclature. Disponible sur <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>, consulté le 02/04/2015.
- ³ Marjele A. and *al.* Protein inhibitors form complexes with procathepsin L and augment cleavage of the propeptide. *Arch. Biochem. Biophys.* **417**, 53–58 (2003).
- ⁴ Puente X. S. and *al.* Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 544–558. (2003).
- ⁵ Drag M. and *al.* Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 690–701 (2010).
- ⁶ Rawlings N. D. and *al.* Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* **290**, 205–218 (1993).
- ⁷ MEROPS : The Peptidase Database. Sur <http://merops.sanger.ac.uk/index.shtml>, consulté le 24/5/2015.
- ⁸ Barrett A. J. and *al.* The MEROPS Database as a Protease Information System. *J. Struct. Biol.* **134**, 95–102 (2001).
- ⁹ Rawlings N.D. and *al.* MEROPS : the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **42**, D503-D509, (2014).
- ¹⁰ Peptidases, families and clans (Proteomics). Sur <http://what-when-how.com/proteomics/peptidases-families-and-clans-proteomics/>, consulté le 24/5/2015.
- ¹¹ Turk, B. Targeting proteases : successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 785–799 (2006).
- ¹² Erez E. and *al.* How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature.* **459**, 371–378 (2009).
- ¹³ Turk V. and *al.* Lysosomal cathepsins : structure, role in antigen processing and presentation, and cancer. *Adv. Enzyme Regul.* **42**, 285–303 (2002).
- ¹⁴ Dunn A. D. and *al.* Thyroglobulin processing by thyroidal proteases. Major sites of cleavage by cathepsins B, D, and L. *J. Biol. Chem.* **266**, 20198–20204 (1991).

-
- ¹⁵ Shen A. Allosteric regulation of protease activity by small molecules. *Molecular BioSystems*. **6**, 8, 1431 (2010).
- ¹⁶ Dickinson C. D. and *al.* Identification of surface residues mediating tissue factor binding and catalytic function of the serine protease factor VIIa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**, 14379–14384 (1996).
- ¹⁷ Faccio L. and *al.* Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. *J. Biol. Chem.* **28**, 2581-2588 (2000).
- ¹⁸ Martins L. M. and *al.* Loss of functions mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's diseases. *Human molecular Genetics*, **14**, 15, 2099-2111 (2005).
- ¹⁹ Plun-Favreau H. and *al.* The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. *Nat. Cell Biol.* **9**, 11, 1243–1252 (2007).
- ²⁰ Plun-Favreau H. and *al.* What have PINK1 and HtrA2 genes told us about the role of mitochondria in Parkinson's disease ?. *N.Y. Academy of Sciences*. **117**, 30-36 (2008).
- ²¹ Jones J. M. and *al.* Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular of *mnd2* mutant mice. *Nature*, **425**, 721-727 (2003).
- ²² Walle V. L. and *al.* The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi : an overview. *Cell Death and Differentiation*. **15**, 453–460 (2008).
- ²³ Lovgren J. and *al.* Enzymatic action of human glandular kallikrein 2(hK2). Substrate specificity and regulation by Zn²⁺ and extracellular protease inhibitors, *Eur. J. Biochem.* **262**, 781-789 (1999).
- ²⁴ Malm J. and *al.* Enzymatic action of prostate-specific antigen (PSA or hK3) : substrate specificity and regulation by Zn²⁺, a tight-binding inhibitor. *Prostate*. **45**, 132–139 (2000).
- ²⁵ Huntington J. A. and *al.* Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, **407**, 923-726 (2000).
- ²⁶ Carlos López-Otín and *al.* Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer*. **7**, 10, 800-808 (2007).
- ²⁷ Neurath H. Evolution of proteolytic enzymes. *Science*, **224**, 4647, 350-357 (1984).
- ²⁸ Teitz T. and *al.* Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of *MYCN*. *Nat. Med.* **6**, 5, 529-535 (2000).

-
- ²⁹ Mohamed M. M. and *al.* Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 764-775 (2006).
- ³⁰ Fisher A. Mechanism of the the proteolytic activity of malignant tissue cells. *Nature* **157**, 442 (1946).
- ³¹ Balbin M. and *al.* Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nat. Genetics* **35**, 252-257 (2003).
- ³² Egeblad M. and *al.* New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 3, 161-174 (2002).
- ³³ Borgoño C. A. and *al.* Human Tissue Kallikreins : Physiologic Roles and Applications in Cancer. *Mol Cancer Res*, **2**, 257-280 (2004).
- ³⁴ Prassas I. and *al.* Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 183-201 (2015).
- ³⁵ Ekici O. D., Paetzel M. and Dalbey R. E. Unconventional serine proteases: Variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein Science* **17**, 2023-2037 (2008).
- ³⁶ Hedstrom L. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chem. Rev.* **102**, 4501-4523 (2002).
- ³⁷ Neitzel J. J. Enzyme Catalysis : The Serine Proteases. *Nature Education.* **3**, 9, 21 (2010).
- ³⁸ Blow D. M. and *al.* Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature.* **221**, 337-340 (1969).
- ³⁹ Rawlings N. D. and *al.* Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* **378**, 705-716 (2004).
- ⁴⁰ Turk B. and *al.* Protease signalling : the cutting edge. *EMBO J.*, **31**, 1630-1643 (2012).
- ⁴¹ INCIVO 375 mg cp pellic : Monographie. At http://www.vidal.fr/Medicament/incivo_375_mg_cp_pellic-110167.htm, consulté le 09/07/2015.
- ⁴² Forestier N. and *al.* Antiviral Activity of Telaprevir (VX-950) and Peginterferon Alfa-2a in Patients with Hepatitis C. *Hepatology*, **46**, 3, 640-648 (2007).
- ⁴³ Wendy B. Young and *al.* Small molecule inhibitors of plasma kallikrein. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 2034-2036 (2006).

-
- ⁴⁴ Adam A. and *al.* Les kinines : leur nature et leur rôle potentiel dans les effets cardiovasculaires des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. *Néphrologie* **21**, 4,163-172 (2000).
- ⁴⁵ Yousef G. M. and *al.* The KLK7 (PRSS6) gene, encoding for the stratum corneum chymotryptic enzyme is a new member of the human kallikrein gene family-genomic characterization, mapping, tissue expression and hormonal regulation. *Gene*. **254**, 119-128 (2000).
- ⁴⁶ Gabra B. H. and *al.* Dualité fonctionnelle des récepteurs des kinines en physiopathologie. *M/S : médecine sciences*, **19**, 11, 1101-1110 (2003) at <http://id.erudit.org/iderudit/010947ar>, consulté le 31/01/2015.
- ⁴⁷ De Agostini A. and *al.* Human plasma kallikrein and Ci inhibitor form a complex possessing an epitope that is not detectable on the parent molecules: demonstration using a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Medical Sciences*. **82**, 5190-5193 (1985).
- ⁴⁸ Griffon C. and *al.* Système kinine-kallicréine et maladies cardiovasculaires : renaissance d'une entité centenaire. *MT cardio*. **1**, 1, 35-46 (2005).
- ⁴⁹ Marceau F. and *al.* The B1 receptors for kinins. *Pharmacol. Rev.* **50**, 3, 357–386 (1998).
- ⁵⁰ Couture M. and *al.* The heme environment of mouse neuroglobin. *J. Biol. Chem.* **276** : 36377–36382 (2001).
- ⁵¹ El-Dahr S.S. and *al.* Ontogeny of bradykinin B2 receptors in the rat kidney: implications for segmental nephron maturation. *Kidney Int.* **51**, 739–749 (1997).
- ⁵² Goto, S. and *al.* Enhancer-trap detection of expression patterns corresponding to the polar coordinate system in the imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Rouxs Arch. Dev. Biol.* **204**, 6, 378-391 (1995).
- ⁵³ Jolivet-Reynaud C. and *al.* Détection des différentes formes du prostate-specific antigen et autres kallicréines dans le cancer de la prostate. *Médecine Nucléaire*, **32**, 24-30 (2008).
- ⁵⁴ Santin A.D. and *al.* Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *Int. J. Cancer*, **112**, 1, 14–25 (2004).
- ⁵⁵ Pampalakis G. and *al.* Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1776**, 22–31 (2007).

-
- ⁵⁶ Ramani V. C. and *al.* The extracellular matrix protein fibronectin is a substrate for kallikrein 7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 1169–1173 (2008).
- ⁵⁷ Goettig P. and *al.* Natural and synthetic inhibitors of kallikrein-related peptidases (KLKs). *Biochimie* **92**, 1546-1567 (2010).
- ⁵⁸ Barrett A. J. and *al.* Managing peptidases in the genomic era. *Biol. Chem.* **384**, 873–882 (2003).
- ⁵⁹ Shaw J. L. V. and *al.* Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. *Clin. Chem.* **53**, 1423-1432 (2007).
- ⁶⁰ Clements J. and *al.* The expanded human kallikrein (KLK) gene family : genomic organisation, tissue-specific expression and potential functions. *Biol. Chem.* **382**, 5-14 (2001).
- ⁶¹ Sondell B. and *al.* Immunolocalization of stratum corneum chymotryptic enzyme in human skin and oral epithelium with monoclonal antibodies: evidence of a proteinase specifically expressed in keratinizing squamous epithelia. *J. Histochem. Cytochem.* **42**, 459-465 (1994).
- ⁶² Ainciburu M. and *al.* Identification d'une nouvelle famille de protéases du tissu bronchique : les kallikréines tissulaires humaines. Expression et fonction de la kallikréine KLK6 - *Revue des Maladies Respiratoires*. **23**, 5, 527 (2006).
- ⁶³ Emami N. and *al.* New insights into the functional mechanisms and clinical applications of the kallikrein-related peptidase family. *Mol. Oncol.* **1**, 269-287 (2007).
- ⁶⁴ Pons S. and *al.* Tissue kallikrein deficiency aggravates cardiac remodelling and decreases survival after myocardial infarction in mice. *Eur. J. Heart Fail.* **10**, 343–351 (2008)
- ⁶⁵ Hart P. S. and *al.* Mutation in kallikrein 4 causes autosomal recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J. Med. Genet.* **41**, 541-549 (2004).
- ⁶⁶ Egelrud T. Purification and preliminary characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme : a proteinase that may be involved in desquamation. *J. Invest. Derm.* **101**, 200-204 (1993).
- ⁶⁷ Deraison C. and *al.* LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction. *Mol. Biol. Cell*, **18**, 3607-3619 (2007).

-
- ⁶⁸ Bando Y. and *al.* Implications of protease M/neurosin in myelination during experimental demyelination and remyelination. *Neurosci. Lett.* **405**, 175-180 (2006).
- ⁶⁹ Yoshida S. KLK8, a multifunctional protease in the brain and skin : analysis of knockout mice. *Biol. Chem.* **391**, 375-380 (2010).
- ⁷⁰ Suzuki J. and *al.* Ontogeny of neuropsin mRNA expression in the mouse brain. *Neuroscience Research* **23**, 345-351 (1995).
- ⁷¹ Yousef G. M. and *al.* Role of kallikrein enzymes in central nervous system. *Clin. Chim. Acta* **329**, 1-8 (2003).
- ⁷² Mei L. and *al.* Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 6, 437-452 (2008).
- ⁷³ Yamashiro K. and *al.* Molecular cloning of a novel trypsin-like serine protease (neurosin) preferentially expressed in brain. *Biochim. Biophys. Acta.* **1350**, 11–14 (1997).
- ⁷⁴ Yamanaka H. and *al.* Protease M/neurosin mRNA is expressed in mature oligodendrocytes. *Molecular Brain Research* **71**, 2, 217-224 (1999).
- ⁷⁵ Scarisbrick I. A. and *al.* Nervous System-Specific Expression of a Novel Serine Protease : Regulation in the Adult Rat Spinal Cord by Excitotoxic Injury. *J. Neurosci.* **17**, 21, 8156-8168 (1997).
- ⁷⁶ Li H.-X. and *al.* Substrate specificity of human kallikreins 1 and 6 determined by phage display. *Protein Science*, **17**, 664–672 (2008).
- ⁷⁷ Engender S. and *al.* Synphilin-1 associates with α -synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. *Nat. Genet.* **22**, 110-114 (1999).
- ⁷⁸ Spillantini M. G. and *al.* α -synuclein in Lewy bodies. *Nature*, **388**, 839-840 (1997).
- ⁷⁹ Bennett M. J. and *al.* Crystal Structure and Biochemical Characterization of Human Kallikrein 6 Reveals That a Trypsin-like Kallikrein Is Expressed in the Central Nervous System. *J. Biol. Chem.* **277**, 27, 24562-24570 (2002).
- ⁸⁰ Iwata A. and *al.* Alpha-synuclein degradation by serine protease neurosin : implication for pathogenesis of synucleinopathies. *Human Molecular Genetics*, **12**, 20, 2625–2635 (2003).
- ⁸¹ Anisowicz A. and *al.* A novel protease homolog differentially expressed in breast and ovarian cancer. *Mol. Med.* **2**, 624-636 (1996).

-
- ⁸² Yousef G. M. and *al.* Parallel Overexpression of Seven Kallikrein Genes in Ovarian Cancer. *Cancer Research* **63**, 2223–2227 (2003).
- ⁸³ Johnson S. K. and *al.* Kallikrein 7 enhances pancreatic cancer cell invasion by shedding E-cadherin, *Cancer*. **109**, 9, 1811–1820 (2007).
- ⁸⁴ Fortier A. H. and *al.* Recombinant prostate specific antigen inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Prostate*. **56**, 212–219 (2003).
- ⁸⁵ Killian C. S. and *al.* Mitogenic response of osteoblast cells to prostate-specific antigen suggests an activation of latent TGF- β and a proteolytic modulation of cell adhesion receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 940–947 (1993).
- ⁸⁶ Sher Y. P. and *al.* Human kallikrein 8 protease confers a favorable clinical outcome in non-small cell lung cancer by suppressing tumor cell invasiveness. *Cancer Res.* **66**, 11763–11770 (2006).
- ⁸⁷ Liu XL and *al.* Identification of a novel serine protease-like gene, the expression of which is down-regulated during breast cancer progression. *Cancer Res.* **6**, 3371–3379 (1996).
- ⁸⁸ Dhar S. and *al.* Analysis of normal epithelial cell specific-1 (NES1)/Kallikrein 10 mRNA expression by in situ hybridization, a novel marker for breast cancer. *Clin Cancer Res.* **7**, 3393–3398 (2001).
- ⁸⁹ Li B. and *al.* CpG Methylation as a Basis for Breast Tumor-specific Loss of NES1/Kallikrein 10 Expression. *Cancer Research* **61**, 8014–8021 (2001).
- ⁹⁰ Borgono C. A. and *al.* Expression and functional characterization of the cancer-related serine protease, human tissue kallikrein 14. *J. Biol. Chem.* **282**, 2405–2422 (2007).
- ⁹¹ Heidtmann H.-H. and *al.* Generation of angiostatin-like fragments from plasminogen by prostate-specific antigen. *Br. J. Cancer*. **81**, 1269–1273 (1999).
- ⁹² Komatsu N. and *al.* Multiple tissue kallikrein mRNA and protein expression in normal skin and skin diseases, *British Journal of Dermatology*. **153**, 274–281 (2005).
- ⁹³ Ménez R. and *al.* Crystal Structure of a Ternary Complex between Human Prostate-specific Antigen, Its Substrate Acyl Intermediate and an Activating Antibody. *J. Mol. Biol.* **376**, 1021–1033 (2008).
- ⁹⁴ Debela M. and *al.* Specificity Profiling of Seven Human Tissue Kallikreins Reveals Individual Subsite Preferences. *J. Biol. Chem.* **281**, 35, 25678–25688 (2006).

-
- ⁹⁵ Debela M. and *al.* Crystal Structures of Human Tissue Kallikrein 4 : Activity Modulation by a Specific Zinc Binding Site. *J. Mol. Biol.* **362**, 1094–1107 (2006).
- ⁹⁶ Debela M. and *al.* Chymotryptic specificity determinants in the 1.0 Å structure of the zinc-inhibited human tissue kallikrein 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 16086-16091 (2007).
- ⁹⁷ Kishi T. and *al.* Activation and enzymatic characterization of recombinant human kallikrein 8, *Biol. Chem.* **387**, 723-731 (2006).
- ⁹⁸ Memari N. and *al.* Enzymatic properties of human kallikrein-related peptidase 12 (KLK12), *Biol. Chem.* **388**, 427-435 (2007).
- ⁹⁹ Costello L. C. and *al.* Role of zinc in the pathogenesis and treatment of prostate cancer : critical issues to resolve. *Prostate Cancer Prostat. Dis.* **7**, 111–117 (2004).
- ¹⁰⁰ Mattsson J. M. and *al.* Proteolytic Activity of Prostate-Specific Antigen (PSA) towards Protein Substrates and Effect of Peptides Stimulating PSA Activity. *Plos One* **9**, 9, e107819 (2014) at www.plosone.org, consulté le 14 avril 2015.
- ¹⁰¹ Fujinaga M. and *al.* Rat Submaxillary Gland Serine Protease, Tonin Structure Solution and Refinement at 14 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **195**, 373-396 (1987).
- ¹⁰² Debela M. and *al.* Structural Basis of the Zinc Inhibition of Human Tissue Kallikrein 5. *J. Mol. Biol.* **373**, 1017–1031 (2007).
- ¹⁰³ Lundwall A. and *al.* Kallikrein-related peptidases. *Cell Mol. Life Sci.* **65**, 2019-2038 (2008).
- ¹⁰⁴ Silvermann G.A. and *al.* The Serpins Are an Expanding Superfamily of Structurally Similar but Functionally Diverse Proteins : Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J. Biol. Chem.* **276**, 36, 33293-33296 (2001).
- ¹⁰⁵ Elliott P. R. and *al.* Topography of a 2.0 Å structure of α_1 -antitrypsin reveals targets for rational drug design to prevent conformational disease. *Protein Science.* **9**, 1274–1281 (2000).
- ¹⁰⁶ Law R. HP. and *al.* An overview of the serpin superfamily. *Genome Biology.* **7**, 5, Article 216 (2006).
- ¹⁰⁷ Engh R. A. and *al.* Divining the serpin inhibition mechanism : a suicide substrate 'springe'? *Trends Biotechnology.* **13**, 503-510 (1995).

-
- ¹⁰⁸ Krowarsch D. and *al.* Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cell Mol. Life Sci.* **60**, 2427-2444 (2003).
- ¹⁰⁹ Rimphanitchayakit V. and *al.* Structure and function of invertebrate Kazal-type serine proteinase inhibitors. *Developmental and Comparative Immunology.* **34**, 377–386 (2010).
- ¹¹⁰ Egelrud T. and *al.* hK5 and hK7, two serine proteinases abundant in human skin, are inhibited by LEKTI domain 6. *Br. J. Dermatol.* **153**, 1200-1203 (2005).
- ¹¹¹ Schechter N. M. and *al.* Inhibition of human kallikreins 5 and 7 by the serine protease inhibitor lympho-epithelial Kazal-type inhibitor (LEKTI). *Biol. Chem.* **386**, 11, 1173-1184 (2005).
- ¹¹² Mitsudo K. and *al.* Inhibition of serine proteinases plasmin, trypsin, subtilisin A, cathepsin G, and elastase by LEKTI : A kinetic analysis. *Biochemistry.* **42**, 3874-3881 (2003).
- ¹¹³ Mägert H.-J. and *al.* LEKTI : a multidomain serine proteinase inhibitor with pathophysiological relevance. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* **34**, 573–576 (2002).
- ¹¹⁴ Mägert H.-J. and *al.* LEKTI, a Novel 15-Domain Type of Human Serine Proteinase Inhibitor. *J. Biol. Chem.* **274**, 31, 21499–21502 (1999).
- ¹¹⁵ Fernández I. S. and *al.* Crystal Structure of Human Epidermal Kallikrein 7 (hK7). Synthesized Directly in its Native State in *E. coli* : Insights into the Atomic Basis of its Inhibition by LEKTI Domain 6 (LD6). *J. Mol. Biol.* **377**, 1488-1497 (2008).
- ¹¹⁶ Meyer-Hoffert U. and *al.* Isolation of SPINK6 in human skin : selective inhibitor of kallikrein-related peptidases. *J. Biol. Chem.* **285**, 32174–32181 (2010).
- ¹¹⁷ Kantyka T. and *al.* Inhibition of kallikrein-related peptidases by the serine protease inhibitor of Kazal-type 6. *Peptides.* **32**, 1187–1192 (2011).
- ¹¹⁸ Meyer C. and *al.* Human α_2 -Macroglobulin—Another Variation on the Venus Flytrap. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 5045 – 5047 (2012).
- ¹¹⁹ Barrett A. J. and *al.* The interaction of α_2 -macroglobulin with proteinases : Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochem. J.* **133**, 709-724 (1973).

-
- ¹²⁰ Sottrup-Jensen L. and *al.* The α -Macroglobulin Bait Region : Sequence diversity and localization of cleavage sites for proteinases in five mammalian α -macroglobulins. *J. Biol. Chem.* **261**, 27, 15781-15789 (1989).
- ¹²¹ Kolodziej S. J. and *al.* The Three-dimensional Structure of the Human α_2 -Macroglobulin Dimer Reveals Its Structural Organization in the Tetrameric Native and Chymotrypsin α_2 -Macroglobulin Complexes. *J. Biol. Chem.* **277**, 31, 28031-28037 (2002).
- ¹²² Marrero A. and *al.* The Crystal Structure of Human α_2 -Macroglobulin Reveals a Unique Molecular Cage. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 3340 –3344 (2012).
- ¹²³ Kristensen T. and *al.* Evidence that the newly cloned low-density-lipoprotein receptor related protein (LRP) is the α_2 -macroglobulin receptor. *FEBS Lett.* **276**, 1, 2, 151-155 (1990).
- ¹²⁴ Borth W. α_2 -Macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. *FASEB J.* **6**, 3345-3353 (1992).
- ¹²⁵ Christensen U. and *al.* Mechanism of α_2 -Macroglobulin-proteinase interactions. Studies with trypsin and plasmin. *Biochemistry.* **23**, 6619-6626 (1984).
- ¹²⁶ Rich D. H. and *al.* Purification of cathepsin B by a new form of affinity chromatography. *Biochem J.* **235**, 731–734 (1986).
- ¹²⁷ Brattsand M. and *al.* A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* **124**, 198-203 (2005).
- ¹²⁸ Fioretti E. and *al.* Kunitz-type Inhibitors in Human Serum : identification and characterization. *J. Biol. Chem.* **262**, 8, 3586-3589 (1987).
- ¹²⁹ Huber R. and *al.* Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor: II. Crystallographic refinement at 1.9 Å resolution, *J. Mol. Biol.* **89**, 73-101 (1974).
- ¹³⁰ Longstaff C. and *al.* studies on the mechanisms of action of Aprotinin and Tranexanic acid as plasmin inhibitors and antifibrinolytic agents. *Blood Coag. Fibrinol.* **5**, 537 – 542 (1994).
- ¹³¹ Söllner C. and *al.* Isolation and characterization of hirustasin, an antistasin-type serine-proteinase inhibitor from the medical leech *Hirudo medicinalis*. *Eur. J. Biochem.* **219**, 937-943 (1994).

-
- ¹³² Sealock R.W. and *al.* Enzymic replacement of the arginyl by a lysyl residue in the reactive site of soybean trypsin inhibitor. *Biochemistry*. **8**, 3703-3710 (1969).
- ¹³³ Song H.K. and *al.* Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator, *J. Mol. Biol.* **275**, 347-363 (1998).
- ¹³⁴ Mittl RE P. and *al.* A new structural class of serine protease inhibitors revealed by the structure of the hirustasin–kallikrein complex. *Structure*. **5**, 2, 253-264 (1997).
- ¹³⁵ Citron M. and *al.* Inhibition of amyloid β -protein production in neural cells by the serine protease inhibitor AEBSF. *Neuron*. **17**, 1, 171-179 (1996).
- ¹³⁶ Nakabo Y. and *al.* Lysis of leukemic cells by human macrophages: inhibition by 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), a serine protease inhibitor. *J. Leukoc. Biol.* **60**, 3, 328-336 (1996).
- ¹³⁷ Robert M. and *al.* Characterization of prostate specific antigen proteolytic activity on its major physiological substrate, the sperm motility inhibitor precursor/semenogelin I, *Biochemistry*. **36**, 3811-3819 (1997).
- ¹³⁸ Shaw E. Cysteiny proteinases and their selective inactivation. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **63**, 271–347 (1990).
- ¹³⁹ Takayama T. K. and *al.* Characterization of hK4 (Prostase), a Prostate-Specific Serine Protease : Activation of the Precursor of Prostate Specific Antigen (pro-PSA) and Single-Chain Urokinase-Type Plasminogen Activator and Degradation of Prostatic Acid Phosphatase. *Biochemistry*. **40**, 50, 15341-15348 (2001).
- ¹⁴⁰ LeBeau A. M. and *al.* Potent and selective Peptidyl Boronic Acid inhibitors of the Serine Protease Prostate-Specific Antigen. *Chem. Biol.* **15**, 665-674 (2008).
- ¹⁴¹ Olivier C. Synthèse et étude pharmacologique d'inhibiteurs des kallicréines plasmatique et tissulaire. *Thèse de Doctorat, Chimie Organique, Minérale et Industrielle – LAPP, Université Montpellier II* (2000).
- ¹⁴² Koistinen H. and *al.* Novel small molecule inhibitors for prostate-specific antigen. *Prostate*. **68**, 1143–1151 (2008).

-
- ¹⁴³ Singh P. and *al.* Mechanistic insights into the inhibition of prostate specific antigen by β -lactam class compounds. *Proteins*. **70**, 1416-1428 (2008).
- ¹⁴⁴ Liang G. and *al.* Human kallikrein 6 inhibitors with a para-amidobenzylamine P1 group identified through virtual screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 2450–2455 (2012).
- ¹⁴⁵ Egelrud T. Purification and preliminary characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme : a proteinase that may be involved in desquamation. *J. Invest. Derm.* **101**, 200-204 (1993).
- ¹⁴⁶ L'épiderme, la peau de l'homme. Disponible sur <http://planete.gaia.free.fr/animal/homme/corps/epiderme.peau.html>, consulté le 24/05/2015.
- ¹⁴⁷ Ramani V. C. and *al.* Desmoglein 2 is a substrate of kallikrein 7 in pancreatic cancer. *BMC Cancer*. **8**, 373 (2008).
- ¹⁴⁸ Caubet C. and *al.* Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J. Invest. Dermatol.* **122**, 5, 1235-1244 (2004).
- ¹⁴⁹ Allen A. and *al.* Significant absorption of topical Tacrolimus in 3 patients with Netherton Syndrome. *Arch. Dermatol.* **137**, 747-750 (2001).
- ¹⁵⁰ Scott G. and *al.* The Proteinase-Activated Receptor-2 Mediates Phagocytosis in a Rho-Dependent Manner in Human Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 529-541 (2003).
- ¹⁵¹ Ekholm E. and *al.* Stratum corneum chymotryptic enzyme in psoriasis. *Arch. Dermatol. Res.* **291**, 195-200 (1999).
- ¹⁵² Nylander-Lundqvist E. and *al.* IL-1 β activation in human epidermis. *J Immunol.* **157**, 1699-704 (1996).
- ¹⁵³ Nestle F. O. and *al.* *N. Engl. J. Med.*, **361**, 496-509 (2009).
- ¹⁵⁴ Psoriasis. Communiqué de presse, OMS, 23 mai 2014. Disponible sur <http://www.who.int/mediacentre/news>, consulté le 24 mai 2015.
- ¹⁵⁵ Briot A. and *al.* Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *J. Exp. Med.* **206**, 1135–1147 (2009).

-
- ¹⁵⁶ Descargues P. and *al.* « Syndrome de Netherton : un modèle d'étude de la régulation de la desquamation / Netherton syndrome : a model for studying the regulation of the desquamation process. *M/S : médecine sciences*. **21**, 5, 457-458 (2005).
- ¹⁵⁷ Salodkar A. D. and *al.* Bamboo Hair in Netherton's Syndrome. *Int. J. Trichology*. **1**, 2, 143-4 (2009).
- ¹⁵⁸ Kumar R. and *al.* Netherton's syndrome. *Indian J. Paediatr. Dermatol.* **15**, 120-122 (2014).
- ¹⁵⁹ Kyriakopoulou L. G. and *al.* Prognostic value of quantitatively assessed KLK7 expression in ovarian cancer. *Clin. Biochem.* **36**, 135-43 (2003).
- ¹⁶⁰ Mo L. and *al.* Human kallikrein 7 induces epithelial-mesenchymal transition-like changes in prostate carcinoma cells : A role in prostate cancer invasion and progression. *Anticancer Res.* **30**, 3413-3420 (2010).
- ¹⁶¹ Zetter B. R. Adhesion molecules in tumor metastasis. *Semin. Cancer Biol.* **4**, 4, 219-229 (1993).
- ¹⁶² Hansson L. and *al.* Cloning, expression, and characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme : a skin-specific human serine proteinase. *J. Biol. Chem.* **269**, 19420-19426 (1994).
- ¹⁶³ MEROPS : the Database of Proteolytic Enzymes, their Substrates and Inhibitors. Sur <http://merops.sanger.ac.uk>., consulté le 29/07/2015.
- ¹⁶⁴ Krastel P. and *al.* Use of cyclic depsipeptides to inhibit kallikrein 7. Patent US 2013/0172267 A1 (2013).
- ¹⁶⁵ Teixeira T. S. and *al.* Biological evaluation and docking studies of natural isocoumarins as inhibitors for human kallikrein 5 and 7. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**, 6112-6115 (2011).
- ¹⁶⁶ Tan X. and *al.* 1,2,4-Triazole derivatives as transient inactivators of kallikreins involved in skin diseases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 4547–4551 (2013).
- ¹⁶⁷ Freitas R. F. and *al.* Isomannide derivatives as new class of inhibitors for human kallikrein 7. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 6072–6075 (2012).
- ¹⁶⁸ Oliveira J. P. C. and *al.* Isomannide-Based Peptidomimetics as Inhibitors for Human Tissue Kallikreins 5 and 7. *ACS Med. Chem. Lett.* **5**, 128–132 (2014).

-
- ¹⁶⁹ Tan X. and *al.* Toward the First Class of Suicide Inhibitors of Kallikreins Involved in Skin Diseases. *J. Med. Chem.* **58**, 598–612 (2015).
- ¹⁷⁰ Gueiffier A. and *al.*, Synthesis of Acyclo-C-nucleosides in the Imidazo[1,2-*a*]pyridine and Pyrimidine Series as Antiviral Agents. *J. Med. Chem.* **39**, 2856-2859 (1996).
- ¹⁷¹ Chaouni-Benabdallah A. and *al.* 3-Benzamido, Ureido and Thioureidoimidazo[1,2-*a*]pyridine Derivatives as Potential Antiviral Agents. *Chem. Pharm. Bull.* **49**, 12, 1631-1635 (2001).
- ¹⁷² Puerstinger G. and *al.* Antiviral 2, 5-disubstituted imidazo[4,5-*c*]pyridines from anti-pestivirus to anti-hepatitis C virus activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 390-393 (2007).
- ¹⁷³ Katsura Y. and *al.* Studies on antiulcer drugs II synthesis and antiulcer activities of imidazo[1,2-*a*]pyridinyl-2-alkylaminobenzoxazoles and 5,6,7,8- tetrahydroimidazo[1,2-*a*]pyridinyl derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 2, 371-380 (1992).
- ¹⁷⁴ Rewankar G. R. and *al.* Synthesis and antimicrobial activity of certain imidazo[1,2-*a*]pyrimidines. *J. Med. Chem.* **18**, 1253-1255 (1975).
- ¹⁷⁵ Rival Y. and *al.* Synthesis and antibacterial activity of some imidazo[1,2- *a*]pyrimidine derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 5, 1170-1176 (1992).
- ¹⁷⁶ Nordqvist A. and *al.* Synthesis, biological evaluation and X-ray crystallographic studies of imidazo[1,2-*a*]pyridine-based *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase inhibitors. *Med. Chem. Comm.* **3**, 5, 620-626 (2012).
- ¹⁷⁷ Ah-Tel T. H. and *al.* Post Groebke-Blackburn multicomponent protocol : Synthesis of new polyfunctional imidazo[1,2-*a*]pyridine and imidazo[1,2-*a*]pyrimidine derivatives as potential antimicrobial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 5848-5855 (2010).
- ¹⁷⁸ Moraski G. C. and *al.* Advent of imidazo[1,2-*a*]pyridine-3-carboxamides with potent multi- and extended drug resistant antituberculosis activity. *Med. Chem. Lett.* **2**, 456-470 (2011).
- ¹⁷⁹ Fisher M. H. and *al.* Imidazo[1, 2-*a*]pyridine Anthelmintic and Antifungal Agents. *J. Med. Chem.* **15**, 982-985 (1972).
- ¹⁸⁰ Biftu T. and *al.* Synthesis and sar studies of very potent imidazopyridine antiprotozoal agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 2479-2483 (2006).

-
- ¹⁸¹ Ismail M. A. and *al.* Synthesis and antiprotozoal activity of novel bis-benzamidinoimidazo[1,2-*a*]pyridines and 5,6,7,8-tetrahydro-imidazo[1,2-*a*]pyridines. *Bioorg Med Chem.* **16**, 683-691 (2008).
- ¹⁸² López-Martínez M. and *al.* Effect of the lipophilic parameter (log P) on the antiparasitic activity of imidazo[1,2-*a*]pyridine derivatives. *Med. Chem. Res.* **21**, 415-420 (2012).
- ¹⁸³ Gudmundsson K. S. and *al.* Imidazo[1,2-*a*]pyridines with potent activity against herpesviruses. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 2735–2739 (2007).
- ¹⁸⁴ Maruyama Y. and *al.* Anti-inflammatory activity of an imidazopyridine derivative (miroprofen). *Arzneimittelforsch.* **31**, 7, 1111-1115 (1981).
- ¹⁸⁵ Abignente E. and *al.* Research on heterocyclic compounds XXIII phenyl derivatives of fused imidazole systems. *J. Heterocyclic Chem.* **26**, 1875-1880 (1989).
- ¹⁸⁶ Hieke M. and *al.* SAR-study on a new class of imidazo[1,2-*a*]pyridine-based inhibitors of 5-lipoxygenase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 1969-1975 (2012).
- ¹⁸⁷ Andaloussi M. and *al.* Novel imidazo[1,2-*a*]naphthyridinic systems (part 1): Synthesis, antiproliferative and DNA-intercalating activities. *Eur. J. Med. Chem.* **43**, 2505-2517 (2008).
- ¹⁸⁸ Dahan-Farkas N. and *al.* 6-Substituted imidazo[1,2-*a*]pyridines: Synthesis and biological activity against colon cancer cell lines HT-29 and Caco-2. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 4573-4583 (2011).
- ¹⁸⁹ Masurier N. and *al.* Imidazonaphthyridine systems (part 2): Functionalization of the phenyl ring linked to the pyridine pharmacophore and its replacement by a pyridinone ring produces intriguing differences in cytotoxic activity. *Eur. J. Med. Chem.* **52**, 137-150 (2012).
- ¹⁹⁰ Chen C.-J. and *al.* Synthesis and biological evaluation of novel radioiodinated imidazopyridine derivatives for amyloid- β imaging in Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 4189–4197 (2014).
- ¹⁹¹ Fuchs K. and *al.* New beta-amyloid inhibitors, processes for preparing them and their use as pharmaceutical compounds. *Patent CA 2417190 A1* (2002).
- ¹⁹² Humphries A. C. and *al.* 8-Fluoroimidazo[1,2-*a*]pyridine : Synthesis, physicochemical properties and evaluation as a bioisosteric replacement for imidazo[1,2-*a*]pyrimidine in an

-
- allosteric modulator ligand of the GABA_A receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 4189–4197 (2006).
- ¹⁹³ Hamdouchi C. and *al.* Short synthesis and anti-rhinoviral activity of imidazo[1,2-*a*]pyridines : the effect of acyl groups at 3-position. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 1391-1394 (1999).
- ¹⁹⁴ Soto J. and *al.* Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis, *Clin. Infect. Dis.* **38**, 1266-1272 (2004).
- ¹⁹⁵ Berson A. and *al.* Mechanisms for experimental buprenorphine hepatotoxicity: major role of mitochondrial dysfunction versus metabolic activation. *J.Hepatol.* **34**, 261-269 (2001).
- ¹⁹⁶ Prasad R. and *al.* Miltefosine : an oral drug for visceral leishmaniasis, *Indian J. Pediatr.* **71**, 143-144 (2004).
- ¹⁹⁷ Cid-Nunez J.M. and *al.* Indole and Benzoxazine Derivatives As Modulators of Metabotropic Glutamate Receptors. *PCT Int. Appl. WO 2010060589* (2010).
- ¹⁹⁸ Alpidem : Hepatotoxicity results in withdrawal. Proposed International Nonproprietary Names for pharmaceutical substances (INN) List 71. *WHO Drug Information.* **8**, 2, page 64 (1994).
- ¹⁹⁹ Alvarez N. and *al.* Inhibition of parasite protein kinase C by new antileishmanial imidazolidin-2-one compounds, *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* **17**, 443-447 (2002).
- ²⁰⁰ Grant K. M. and *al.* The *crk3* gene of *Leishmania mexicana* encodes a stage-regulated *cdc2*-related histone H1 kinase that associates with *p12cks1*, *J. Biol. Chem.* **273**, 10153-10159 (1998).
- ²⁰¹ Kurokawa S. and *al.* Effects of olprinone on hemodynamics and oxygen delivery in pediatric cardiac surgery : Magnitude of effects and comparison to milrinone. *Eg. J. Anaesth.*, **29**, 343-350 (2013).
- ²⁰² Hong K. S. and *al.* Rifaximin for the treatment of acute infectious diarrhea. *Therap. Adv. Gastroenterol.* **4**, 4, 227-235 (2011).
- ²⁰³ Rifaximin. Sur <http://www.drugs.com/ingredient/rifaximin.html>, consulté le 25/07/2015.
- ²⁰⁴ DuPont H. L. and *al.* Therapeutics effects and mechanisms of action of rifaximini in gastrointestinal diseases. *Mayo Clin. Proc.* (2015) : in press

-
- ²⁰⁵ Hegde S. and *al.* « To Market, To Market - 2009. 16. Minodronic acid », *Annual Reports in Medicinal Chemistry* 509–510 (2009).
- ²⁰⁶ Sorbera L. A. and *al.* Minodronic acid. *Drugs Fut.*, **27**, 10, 935 (2002).
- ²⁰⁷ Wetzker R. and *al.* Phosphoinositide 3-kinases targets for therapeutic intervention. *Curr. Pharm. Des.* **10**, 1915 (2004).
- ²⁰⁸ Berndt A. and *al.* The p110 δ structure : mechanisms for selectivity and potency of new PI(3)K inhibitors. *Nat. chem. Boil.* **6**, 117-124 (2010).
- ²⁰⁹ Vlahos C. J. and *al.* A Specific Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase, 2-(4-Morpholinyl)-phenyl-4H-1-benzopyran-4 (LY294002). *J. Biol. Chem.* **269**, 7, 5241-5248 (1994).
- ²¹⁰ Hayakawa M. and *al.* Imidazopyridine derivatives. *Patent US20020151549 (A1)* (2002).
- ²¹¹ Schmidt-Kittler O. and *al.* PI(3)K α Inhibitors That Inhibit Metastasis. *Oncotarget.* **1**, 339 – 348 (2010).
- ²¹² Borgne A. and *al.* Inhibiteurs chimiques des kinases dépendantes des cyclines : recherche et applications thérapeutiques potentielles. *Médecine/sciences.* **15**, 496-503 (1999).
- ²¹³ Anderson M. and *al.* Imidazo[1,2-*a*]pyridines : A Potent and Selective Class of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Identified Through Structure-Based Hybridisation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 3021–3026 (2003).
- ²¹⁴ Engler T. A. and *al.* Substituted 3-Imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl-4-(1,2,3,4-tetrahydro-[1,4]diazepino-[6,7,1-*hi*]indol-7-yl)pyrrole-2,5-diones as Highly Selective and Potent Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3. *J. Med. Chem.* **47**, 3934-3937 (2004).
- ²¹⁵ Engler T. A. and *al.* The development of potent and selective bisarylmaleimide GSK3 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 899–903 (2005).
- ²¹⁶ Feng S. and *al.* Discovery of Imidazopyridine Derivatives as Highly Potent Respiratory Syncytial Virus Fusion Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **6**, 359–362 (2015).
- ²¹⁷ Cianci C. and *al.* Antiviral activity and molecular mechanism of an orally active respiratory syncytial virus fusion inhibitor. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**, 289–292 (2005).
- ²¹⁸ Bagdi A. K. and *al.* Synthesis of imidazo[1,2-*a*]pyridines : a decade Update. *Chem. Commun.* **51**, 1555-1575 (2015).

-
- ²¹⁹ Tschitschibabin A.E. Tautomerism of α -aminopyridine. IV. A method of preparation of pyrimidazole and its homologs, *Ber.* **58B**, 1704-1706 (1925).
- ²²⁰ Fisher M. H. and *al.* A. Imidazo[1,2-*a*]pyridine anthelmintic and antifungal agents. *J. Med. Chem.* **15**, 9, 982-985 (1972).
- ²²¹ Lombardino J. G. Preparation and New Reactions Imidazo[1,2-*a*]pyridines. *J. Org. Chem.* **30**, 2403-2407 (1965).
- ²²² Chezal J. M. and *al.* Synthesis and antiviral activity of an imidazo[1,2-*a*]pyrrolo[2,3-*c*]pyridine series against the bovine viral diarrhea virus. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 2044-2047 (2010).
- ²²³ Enguehard C. and *al.* Synthesis of Diaryl-Substituted Imidazo[1,2-*a*]pyridines Designed as Potential Aromatase Inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* **48**, 935-940 (2000).
- ²²⁴ Chunavala K.C. and *al.* Thermal and microwave-assisted rapid syntheses of substituted imidazo[1,2-*a*]pyridines under solvent- and catalyst-free conditions. *Synthesis*. **42**, 635–641 (2011).
- ²²⁵ Marhadour S. Synthèse et évaluation biologique d'imidazo[1,2-*a*]pyridines et d'imidazo[1,2-*a*]pyrazines. *Thèse de Doctorat, Université de Nantes*. (2012).
- ²²⁶ Yadav J. S. and *al.* Cu(OTf)₂-catalyzed synthesis of imidazo[1,2-*a*]pyridines from α -diazoketones and 2-aminopyridines. *Tetrahedron Lett.* **48**, 7717–7720 (2007).
- ²²⁷ Ye T. and *al.* Organic Synthesis with α -Diazo Carbonyl Compounds. *Chem. Rev.*, **94**, 4, 1091–1160 (1994).
- ²²⁸ Ugi I. and *al.* Multicomponent reactions in organic chemistry *Endeavour*. **18**, 115-122 (1994).
- ²²⁹ Domling A. and *al.* The seven-component reaction. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **32**, 563-564 (1993).
- ²³⁰ Elders N. and *al.* The Efficient One-Pot Reaction of up to Eight Components by the Union of Multicomponent Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 32, 5856-5859 (2009).
- ²³¹ Passerini M. Isonitriles. II. Compounds with aldehydes or with ketones and monobasic organic acids. *Gazz. Chim. Ital.* **51**, 181-189 (1921).
- ²³² Ugi I. and *al.* Versuche mit isonitrilen. *Angew. Chem.* **71**, 386 (1959).
- ²³³ Ugi I. and *al.* Über ein neues Kondensations-Prinzip. *Angew. Chem.* **72**, 267-268 (1960).

-
- ²³⁴ Groebke K. and *al.* Synthesis of Imidazo[1,2-*a*] annulated Pyridines, Pyrazines and Pyrimidines by a Novel Three-Component Condensation. *Synlett.* **6**, 661-663 (1998).
- ²³⁵ Blackburn C. and *al.* Parallel Synthesis of 3-Aminoimidazo[1,2-*a*]pyridines and pyrazines by a New Three-Component Condensation. *Tetrahedron Lett.* **39**, 3635-3638 (1998).
- ²³⁶ Blackburn C. A Three-Component Solid-Phase Synthesis of 3-Aminoimidazo[1,2-*a*]azines. *Tetrahedron Lett.* **39**, 5469-5472 (1998).
- ²³⁷ Bienaymé H. and *al.* A New Heterocyclic Multicomponent Reaction For the Combinatorial Synthesis of Fused 3-Aminoimidazoles. *Angew. Chem.* **37**, 2234-2237 (1998).
- ²³⁸ Welton T. Room-Temperature Ionic Liquids. Solvents for Synthesis and Catalysis. *Chem. Rev.* **99**, 2071-2083 (1999).
- ²³⁹ Jain N. and *al.* Chemical and biochemical transformations in ionic liquids. *Tetrahedron.* **61**, 1015-1060 (2005).
- ²⁴⁰ Earle M. J. and *al.* Ionic liquids. Green solvents for the future. *Pure Appl. Chem.* **72**, 1391-1398 (2000).
- ²⁴¹ Parchinsky V. Z. and *al.* Multi-component reactions between 2-aminopyrimidine, aldehydes and isonitriles : the use of a nonpolar solvent suppresses formation of multiple products. *Tetrahedron Lett.* **47**, 947-951 (2006).
- ²⁴² Subba Reddy B.V. and *al.* InBr₃-catalyzed three-component, one-pot synthesis of imidazo[1,2-*a*]pyridines. *Tetrahedron Lett.* **52**, 5789–5793 (2011).
- ²⁴³ Tajbakhsh M. and *al.* Nano Fe₃O₄ supported biimidazole Cu (I) complex as a retrievable catalyst for the synthesis of imidazo[1,2-*a*]pyridines in aqueous medium. *RSC Adv.* **4**, 23116–23124 (2014).
- ²⁴⁴ Talbot E. P. A. and *al.* Gold-Catalyzed Redox Synthesis of Imidazo[1,2-*a*]pyridines using Pyridine N-Oxide and Alkynes. *Adv. Synth. Catal.* **356**, 687 – 691 (2014).
- ²⁴⁵ Ru-Long Y. and *al.* Cu(I)-Catalyzed Synthesis of Imidazo[1,2-*a*]pyridines from Aminopyridines and Nitroolefins Using Air as the Oxidant. *J. Org. Chem.* **77**, 2024–2028 (2012).

-
- ²⁴⁶ Santra S. and *al.* Iron(III)-Catalyzed Cascade Reaction between Nitroolefins and 2-Aminopyridines : Synthesis of Imidazo[1,2-*a*]pyridines and Easy Access towards Zolimidine. *Adv. Synth. Catal.* **355**, 1065-1070 (2013).
- ²⁴⁷ Kamarul M. and *al.* Unprecedented Catalytic Activity of $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$: Regioselective Synthesis of 2-Nitroimidazopyridines *via* Oxidative Amination. *Org. Lett.* **16**, 4630–4633 (2014).
- ²⁴⁸ Bochi R. J. and *al.* Isomeric Phenylthioimidazo[1,2-*a*]pyridines as Anthelmintics. *J. Med. Chem.* **24**, 1483-1487 (1981).
- ²⁴⁹ Hamdouchi C. and *al.* Chemoselective arylsulfenylation of 2-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridines by phenyliodine (III) bis(trifluoroacetate) (PIFA). *Synthesis.* **6**, 867-872 (1998).
- ²⁵⁰ Hamdouchi C. and *al.* 2-Amino-3-substituted-6-[(*E*)-1-phenyl-2-(*N*-methylcarbamoyl)vinyl]imidazo[1,2-*a*]pyridines as a novel class of inhibitors of human rhinovirus : stereospecific synthesis and antiviral activity. *J. Med. Chem.* **42**, 50-59 (1999).
- ²⁵¹ Chezal J.-M. and *al.* Aminoimidazo[1,2-*a*]pyridines: regioselective synthesis of substituted imidazonaphthyridines, azacarbolines and cyclazines, *Tetrahedron*, **58**, 295-307 (2002).
- ²⁵² Mosby W. L. Heterocyclic systems with bridgehead nitrogen atoms. *Weissberger A, Ed. Interscience Publishers, Inc., New York.* **15**, 460 (1961).
- ²⁵³ Paolini J.P. and *al.* Aromaticity in Heterocyclic Systems. IV. Substitution Reactions of Imidazo[1,2-*a*]pyridine and Related Methyl Derivatives. *J. Org. Chem.* **30**, 4085-4090 (1965).
- ²⁵⁴ Subbotina J. O. and *al.* Synthetic and Theoretical Aspects of New Dimroth Rearrangement of 6-Aminopyran-2-ones to 6-Hydroxypyridin-2-ones *via* Carbamoyl Ketenes. *Eur. J. Org. Chem.* 2914–2923 (2005).
- ²⁵⁵ Guerret P. and *al.* An investigation of the minimal structural conditions for the Dimroth-type rearrangement in the polyazaindolizine series. *J. Heterocyclic Chem.* **8**, 643-650 (1971).
- ²⁵⁶ Jacquier R. and *al.* Intermédiaires dans le rearrangement de Dimroth d'imidazo[1,2-*a*]pyridines. *J. Heterocyclic Chem.* **10**, 755-762 (1973).

-
- ²⁵⁷ Rahimizadeh M. and *al.* Vicarious nucleophilic substitution in nitro derivatives of imidazo[1,2-*a*]pyridine. *Mendeleev Commun.* **19**, 161-162 (2009).
- ²⁵⁸ Mieczyslaw M. and *al.* Vicarious Nucleophilic Substitution of hydrogen. *Acc. Chem. Res.* **20**, 282-289 (1987).
- ²⁵⁹ Paudler W. W. and *al.* RMN spectra and π -electron densities of some imidazo[1,2-*a*]pyridines. *Tetrahedron.* **21**, 353-361 (1965).
- ²⁶⁰ Arriau J. and *al.* Approche théorique de la réactivité des azaindènes : 2-imidazo[1,2]azines. *J. Heterocyclic Chem.* **11**, 6, 1013 (1964).
- ²⁶¹ Marhadour S. and *al.* Synthesis and biological evaluation of 2,3-diarylimidazo[1,2-*a*]pyridines as antileishmanial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **58**, 543-556 (2012).
- ²⁶² Hand E. S. and *al.* Imidazo[1,2-*a*]pyridine 1 -Oxide. Synthesis and Chemistry of a Novel Type of N-Oxide. *J. Org. Chem.* **43**, 658-663 (1978).
- ²⁶³ Salbadol N. O. and *al.* Synthesis of imidazo[1,2-*a*]pyridines directly from methyl or methylene ketones. Iodination of imidazo[1,2-*a*]pyridines. *Chem. Heterocycl. Compd.* **12**, 10, 1155-1162 (1976).
- ²⁶⁴ Gudmundsson K. S. and *al.* Palladium Catalyzed Coupling of 2,6-Dichloro-3-iodoimidazo[1,2-*a*]pyridine and 2,3-Dihydrofuran as an Approach to Novel Imidazo[1,2-*a*]pyridine C-nucleosides. *Tetrahedron Lett.* **37**, 6275-6278 (1996).
- ²⁶⁵ Bahlaouan Z. Réactivité cupro-catalysée des systèmes mono, di et triodés porteurs d'une fonction acide carboxylique ou dérivée. Applications à la synthèse de nouveaux hétérocycles. *Thèse de Doctorat-Université de Tours.* (2011).
- ²⁶⁶ Marhadour S. and *al.* An efficient access to 2,3-diarylimidazo[1,2-*a*]pyridines *via* imidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl triflate through a Suzuki cross-coupling reaction-direct arylation sequence. *Tetrahedron Lett.* **53**, 3, 297-300 (2012).
- ²⁶⁷ Enguehard-Gueiffier C. and *al.* Convenient Synthesis of Alkenyl-, Alkynyl-, and Allenyl-Substituted Imidazo[1,2-*a*]pyridines *via* Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions. *Helv. Chim. Acta.* **90**, 2349 (2007).
- ²⁶⁸ Hellal M. and *al.* 6-*endo*-dig Cyclization of heteroarylesters to alkynes promoted by Lewis acid catalyst in the presence of Brønsted acid. *Tetrahedron Lett.* **49**, 62-65 (2008).

-
- ²⁶⁹ Akkaoui A. E. and *al.* Pd-catalyzed regiocontrolled Sonogashira and Suzuki cross-coupling reaction of 3,6-dihalogenoimidazo[1,2-*a*]pyridines : one-pot double-coupling approach. *Tetrahedron*. **67**, 7128-7138 (2011).
- ²⁷⁰ Oudot R. and *al.* Grignard reagent-promoted 6-endo-dig cyclization : instantaneous synthesis of original dipyrdo[1,2-*a*:3',4'-*d*]imidazole. *Tetrahedron*. **67**, 9576-9581 (2011).
- ²⁷¹ Koubachi J. and *al.* Intramolecular arylation reactions : first efficient synthesis of novel fused pyridoimidazoquinolinones or pyridoimidazoazepinones libraries. *Tetrahedron* **66**, 1937-1946 (2010).
- ²⁷² Jie X. and *al.* Palladium-Catalyzed Oxidative Cross-Coupling between Heterocycles and Terminal Alkynes with Low Catalyst Loading. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 3630-3633 (2013)
- ²⁷³ Wang Y. and *al.* Efficient Access to 2,3-Diarylimidazo[1,2-*a*]pyridines *via* a One-Pot, Ligand-Free, Palladium-Catalyzed Three-Component Reaction under Microwave Irradiation. *Org. Lett.* **16**, 3016–3019 (2014).
- ²⁷⁴ Hua C. and *al.* Direct Arylation of Imidazo[1,2-*a*]pyridine at C-3 with Aryl Iodides, Bromides, and Triflates via Copper(I)-Catalyzed C-H Bond Functionalization. *Org. Lett.* **14**, 1688-1691 (2012).
- ²⁷⁵ Gueiffier A. and *al.* Synthesis of Imidazo[1,2-*a*]pyridines as Antiviral Agents. *J. Med. Chem.* **41**, 5108-5112 (1998).
- ²⁷⁶ Almirante L. and *al.* Derivatives of Imidazole. I. Synthesis and Reactions of Imidazo[1,2-*a*]pyridines with Analgesic, Antiinflammatory, Antipyretic, and Anticonvulsant Activity. *J. Med. Chem.* **8**, 305 (1965).
- ²⁷⁷ Graziano C. and *al.* A process for the preparation of 2-phenyl-imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-acetamides. *European Patent 1 172 364 A1* (2002).
- ²⁷⁸ Chaubet G. and *al.* A tandem aza-Friedel-Crafts reaction/Hantzsch cyclization : a simple procedure to access polysubstituted 2-amino-1,3-thiazoles. *Tetrahedron*. **67**, 4897-4904 (2011).
- ²⁷⁹ Pericherla K. and *al.* One-pot, three-component synthesis of 1-amidomethyl-imidazo[1,2-*a*]pyridines catalyzed by ytterbium triflate. *Tetrahedron Lett.* **53**, 1253-1257 (2012).

-
- ²⁸⁰ Masurier N. and *al.* New Opportunities with the Duff Reaction. *J. Org. Chem.* **73**, 5989–5992 (2008).
- ²⁸¹ Kona S. and *al.* A Convenient Synthesis of C-3-Aryloxymethyl Imidazo[1,2-*b*]Pyridine Derivatives. *Journal of Chemistry*. doi.org/10.1155/2013/296792 (2013)
- ²⁸² Ogata Y. and *al.* Kinetics and mechanism of the Duff reaction. *Tetrahedron*. **24**, 5001–5010 (1968).
- ²⁸³ Chayer S. and *al.* Regiospecific Thermal C-Acylation of Imidazo [1,2-*a*]Pyridines via an N-Acylimidazolium Intermediate. *Tetrahedron Lett.* **39**, 9685–9688 (1998).
- ²⁸⁴ Masurier N. and *al.* Selective C-Acylation of 2-Aminoimidazo[1,2-*a*]pyridine : Application to the Synthesis of Imidazopyridine-Fused [1,3]Diazepinones. *J. Org. Chem.* **77**, 3679–3685 (2012).
- ²⁸⁵ Tan X. and *al.* Identification by *in silico* and *in vitro* screenings of small organic molecules acting as reversible inhibitors of kallikreins. *Eur. J. Med. Chem.* **70**, 661–668 (2013).
- ²⁸⁶ Hamdouchi C. and *al.* A Novel Application of the Ullmann Coupling Reaction for the Alkylsulfenylation of 2-Amino-Imidazo[1,2-*a*]pyridine. *Tetrahedron*. **55**, 541–548 (1999).
- ²⁸⁷ Jaramillo C. and *al.* Stereodynamics of Ar–CO rotation and conformational preferences of 2-amino-3-(2,4-difluorobenzoyl)-imidazo[1,2-*a*]pyridine. *Tetrahedron*. **62**, 12415–12419 (2006).
- ²⁸⁸ Fodor G. and *al.* The mechanism of the Bischler-Napieralski reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **11**, 10, 919–920 (1972).
- ²⁸⁹ Zhu Z. and *al.* Design and discovery of 1,3-benzodiazepines as novel dopamine antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 5218–5221 (2009).
- ²⁹⁰ Asano T. and *al.* Benzamides and benzamidines as specific inhibitors of epidermal growth factor receptor and v-Src protein tyrosine kinases. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 3529–3542 (2004).
- ²⁹¹ Asano T. and *al.* Synthesis and biological evaluation of benzamides and Benzamidines : structural requirement of a pyrimidine ring for inhibition of EGFR tyrosine kinase. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 2299–2302 (2004).

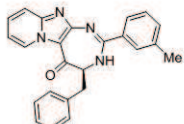
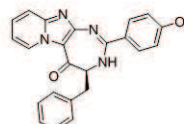
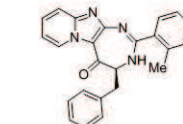
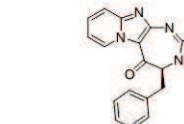
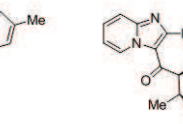
-
- ²⁹² Patil A. and *al.* Synthesis and antiulcer activity of 2-[5-substituted-1-*H*-benzo(d) imidazol-2-yl sulfinyl]methyl-3-substituted quinazoline-4-(3*H*) ones. *J. Chem. Sci.* **122**, 3, 443-450 (2010).
- ²⁹³ Giri R. S. and *al.* Design, synthesis and evaluation of novel 2-thiophen-5-yl-3*H*-quinazolin-4-one analogues as inhibitors of transcription factors NF- κ B and AP-1 mediated transcriptional activation : Their possible utilization as anti-inflammatory and anti-cancer agents. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 2796–2808 (2010).
- ²⁹⁴ Yan Y. and *al.* A reverse method of diversity introduction to synthesize H⁺/K⁺-ATP enzyme inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 4189–4192 (2011).
- ²⁹⁵ Bellamy F. D. and *al.* Selective reduction of aromatic nitro compounds with stannous chloride in non acidic and non aqueous medium. *Tetrahedron Lett.* **25**, 8, 839-842 (1984).
- ²⁹⁶ Ongarora D. S. B. and *al.* Benzoheterocyclic amodiaquine analogues with potent antiplasmodial activity : Synthesis and pharmacological evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 5046–5050 (2012).
- ²⁹⁷ Gavara L. and *al.* Toward new camptothecins. Part 4 : On the reactivity of nitro and amino precursors of aza analogs of 5-methoxycarbonyl camptothecin. *Tetrahedron.* **63**, 9456-9464 (2007).
- ²⁹⁸ Khodaei M. M. and *al.* H₂O₂/Tf₂O system : An efficient oxidizing reagent for selective oxidation of sulfanes. *Synthesis.* **11**, 1682-1684 (2008).
- ²⁹⁹ Khodaei M. M. and *al.* POCl₃ as a catalytic activator for H₂O₂ activation in selective sulfide oxidation. *Journal of Sulfur Chemistry.* **30**, 6, 581-584 (2009).
- ³⁰⁰ Cee C. V. and *al.* Azole compounds as pim inhibitors. *Patent WO2012129338 A1*. page 254 (2012).
- ³⁰¹ Deng J. and *al.* Preparation of substituted sulfoxide compounds for the treatment of gastric acid diseases. *PCT Int. Appl.* **2006099810** (28 sept 2006).
- ³⁰² Mather B. D. and *al.* Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies. *Prog. Polym. Sci.* **31**, 487–531 (2006).
- ³⁰³ Lin C. and *al.* I₂-catalyzed Michael addition of indole and pyrrole to nitroolefins. *Tetrahedron.* **61**, 11751–11757 (2005).

-
- ³⁰⁴ Cheng P. and *al.* Synthesis and Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activity of (*E*)-*N*-Phenylstyryl-*N*-alkylacetamide Derivatives. *Molecules*. **14**, 3176–3186 (2009).
- ³⁰⁵ Thompson A. M. and *al.* Synthesis, Reduction Potentials, and Antitubercular Activity of Ring A/B Analogues of the Bio-reductive Drug (6*S*)-2-Nitro-6-{[4-(trifluoromethoxy)benzyl]oxy}-6,7-dihydro-5*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]oxazine (PA-824). *J. Med. Chem.* **52**, 637–645 (2009).
- ³⁰⁶ Herrera R. P. and *al.* Catalytic Enantioselective Friedel–Crafts Alkylation of Indoles with Nitroalkenes by Using a Simple Thiourea Organocatalyst. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 6576–6579 (2005).
- ³⁰⁷ Itoh J. and *al.* Chiral Phosphoric Acid Catalyzed Enantioselective Friedel–Crafts Alkylation of Indoles with Nitroalkenes : Cooperative Effect of 3 Å Molecular Sieves. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 4016–4018 (2008).
- ³⁰⁸ Simpson A. J. and *al.* Enantioselective Nickel-Catalyzed Michael Additions of 2-Acetylazarenes to Nitroalkenes. *Org. Lett.* **15**, 11 (2013).
- ³⁰⁹ Wang K. and *al.* One-Pot Synthesis of 2-Amino-indole-3-carboxamide and Analogous. *ACS Comb. Sci.* **13**, 2, 140–146 (2011).
- ³¹⁰ Lakatos S. A. and *al.* Diazepines[1,4] annelated with indoline and maleimide from 3-(di)alkylamino-4-(indol-1-yl)maleimides : mechanism of rearrangement and cyclization. *Tetrahedron*. **61**, 2017–2020 (2005).
- ³¹¹ Danilenko V. N. and *al.* Search for inhibitors of bacterial and human protein kinases among derivatives of diazepines [1,4] annelated with maleimide and indole cycles. *J. Med. Chem.* **51**, 7731–7736 (2008).
- ³¹² Zhou Y. and *al.* Silver- and Gold-Mediated Domino Transformation : A Strategy for Synthesizing Benzo[*e*]indolo[1,2-*a*]pyrrolo/pyrido[2,1-*c*][1,4]-diazepine-3,9-diones. *J. Org. Chem.* **76**, 1239–1249 (2011).
- ³¹³ Snyder H. R. and *al.* Synthesis of Indoles by Catalytic Reduction of *o*-Nitrobenzyl Cyanides. *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 4622–4625 (1958).
- ³¹⁴ Bourdais J. and *al.* Une synthèse directe des indole-carboxamides-3 : Nouvel accès aux dérivés de la Gramine. *Tetrahedron Lett.* **3**, 195–198 (1970).

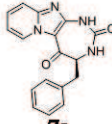
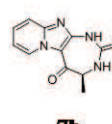
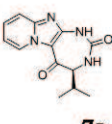
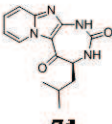
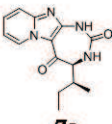
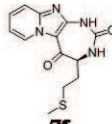
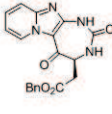
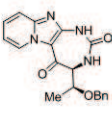
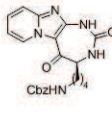
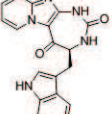
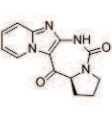
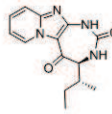
-
- ³¹⁵ Belley M. and *al.* Synthesis of N-aminoindole ureas from ethyl 1-amino-6-(trifluoromethyl)-1H-indole-3-carboxylate. *Synlett.* **2**, 222-225 (2001).
- ³¹⁶ Walkington A. and *al.* A two-step synthesis of Indoles. *Synth. Commun.* **33**, 13, 2229-2233 (2003).
- ³¹⁷ Michel B. and *al.* Synthesis and reactivity of N-hydroxy-2-aminoindoles. *Tetrahedron Lett.* **47**, 159-162 (2006).
- ³¹⁸ Kost A. N. and *al.* Synthesis of α -Carbolines and Pyrimido[1,2-*a*]indoles from 2-Aminoindoles. *Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinenii.* **6**, 3, 359-363 (1970).
- ³¹⁹ Matsumoto T. and *al.* Synthesis and mutagenic activity of alkyl derivatives of 2-amino-9H-pyrido[2,3-*b*]indole. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 9, 2031-2035 (1981).
- ³²⁰ Belley M. and *al.* Synthesis and reactivity of N-hydroxy-2-aminoindoles. *Tetrahedron Lett.* **47**, 159-162 (2006).
- ³²¹ Kebrle J. and *al.* Zur Kenntnis des 2-Aminoindols und einiger seiner Derivate. *Helvetica Chimica Acta.* **39**, 14, 114-131 (1956).
- ³²² Deaudelin P. and *al.* Diastereoselective Pictet-Spengler Approach for the Synthesis of Pyrrolo[3,2-*e*][1,4]diazepin-2-one Peptide Turn Mimics. *Org. Lett.* **10**, 13, 2841-2844 (2008).
- ³²³ Sharma S. K. and *al.* Application of 7-*endo-trig* Pictet-Spengler Cyclization to the Formation of the Benzazepine Ring : Synthesis of Benzazepinoindoles. *Eur J. Org. Chem.* 1309-1312 (2009).
- ³²⁴ Denoyelle S. and *al.* Synthesis of thieno[3,2-*e*][1,4]diazepin-2-ones : application of a free-catalyst Pictet-Spengler reaction. *Eur. J. Org. Chem.* 2015, in press.
- ³²⁵ Bonnet D. and *al.* Solid-phase synthesis of tetrahydro- β -carboline-hydantoins via the N-acyliminium Pictet-Spengler reaction. *J. Comb. Chem.* **4**, 546-548 (2002).
- ³²⁶ Baffoe J. and *al.* Copper-Mediated N-Heteroarylation of Primary Sulfonamides : Synthesis of Mono-N-heteroaryl Sulfonamides. *Org. Lett.* **12**, 1532-1535 (2010).

Fiche récapitulative des composés finaux¹

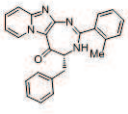
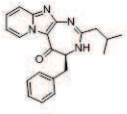
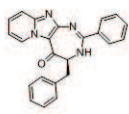
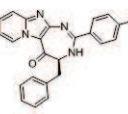
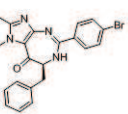
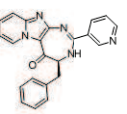
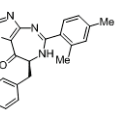
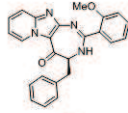
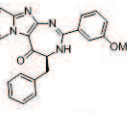
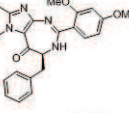
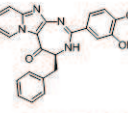
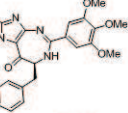
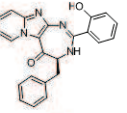
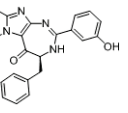
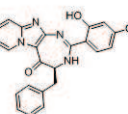
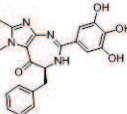
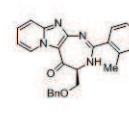
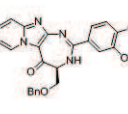
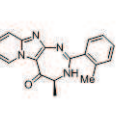
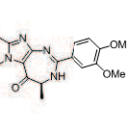
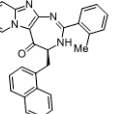
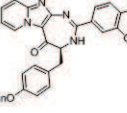
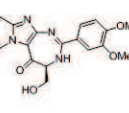
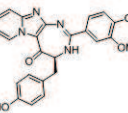
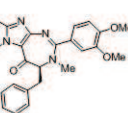
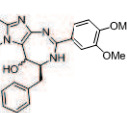
Quelques composés issus du criblage initial

				
JMV4833	JMV4912	JMV4967	JMV4968	JMV4974
[380], (ND)	[396], (72 ± 1,9)	[380], (57 ± 1,0)	[380], (68 ± 3,1)	[398], (59 ± 2,2)

Composés de la série "Urée"

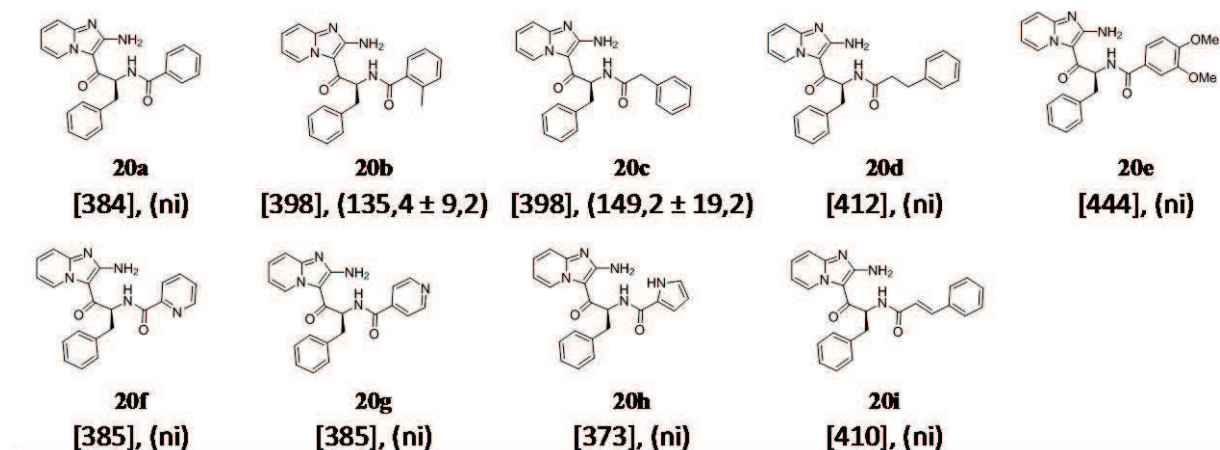
					
7a	7b	7c	7d	7e	7f
[306], (< 2%)	[230], (< 2%)	[259], (< 2%)	[278], (< 2%)	[272], (< 2%)	[290], (< 2%)
					
7g	7h	7i	7j	7k	7l
[364], (< 2%)	[350], (< 2%)	[421], (< 2%)	[345], (10%)	[256], (< 2%)	[272], (< 2%)

Composés analogues du JMV4967

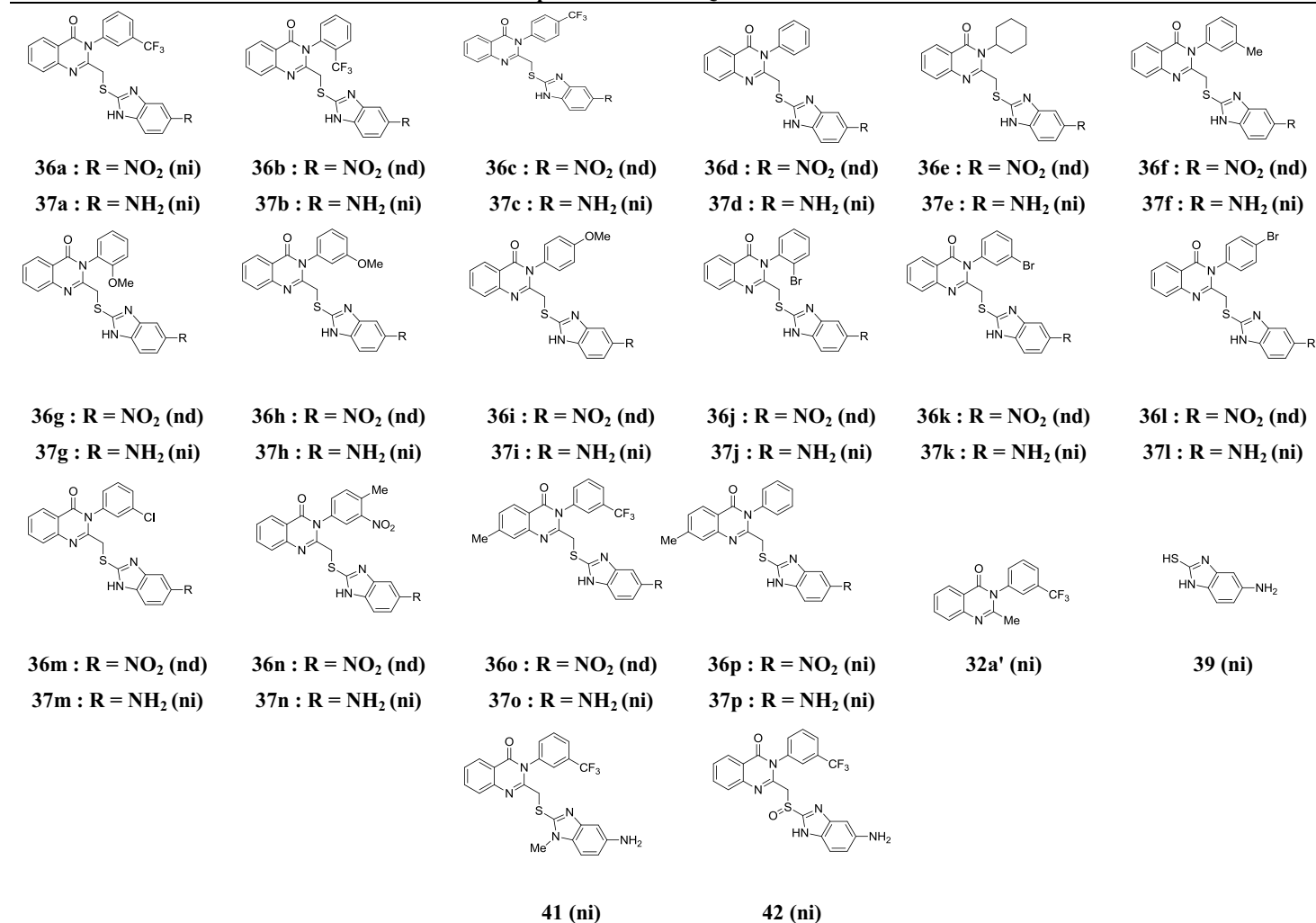
						
10	11a	11b	11c	11d	11e	11f
[380], (95,9 ± 1,7)	[346], (ni)	[366], (ni)	[411], (ni)	[444], (ni)	[367], (ni)	[394], (83,9 ± 1,7)
						
11g	11h	11i	11j (JMV5046)	11k	12a	12b
[396], (98,9 ± 10,2)	[396], (ni)	[426], (80,9 ± 2,5)	[426], (33,5 ± 1,5)	[456], (55,7 ± 2,3)	[382], (ni)	[382], (124,8 ± 1,4)
						
12c	12d	13a	13b	13d	13e	13f
[398], (ni)	[414], (ni)	[410], (ni)	[456], (ni)	[304], (ni)	[350], (ni)	[430], (ni)
						
13g	14	15	16	17		
[532], (ni)	[366], (ni)	[442], (ni)	[440], (ni)	[428], (ni)		

¹ Sont indiqués sous chaque composé : En gras, le numéro d'identification dans le manuscrit ; entre crochets, la masse molaire (g/mol) ; entre parenthèses, l'IC₅₀ (μM) ou le pourcentage d'inhibition. *nd* : non déterminé ; *ni* : non inhibition

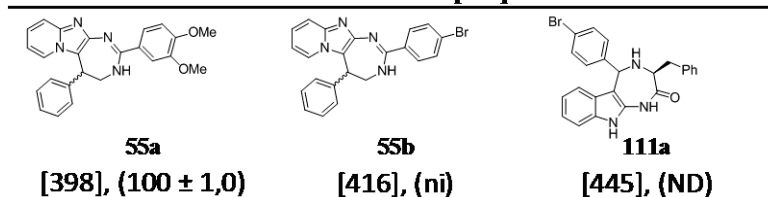
Composés de la série "Amide"



Composés de la série "Quinazolinone"



Autres dérivés diazépiniques



Résumé

Les kallikréines (KLKs) tissulaires humaines sont des protéases à sérine « (chymo)trypsine-like » impliquées dans divers processus physiologiques. Parmi les 15 isoformes connues dans la littérature, la kallikréine 7 (KLK7) est particulièrement impliquée dans les processus de desquamation. La dérégulation de cette enzyme est associée à diverses atteintes dermatologiques, telles que le psoriasis ou la maladie de Netherton. Il est également admis que cette enzyme participe à l'invasion tumorale, et à la progression du cancer de la prostate, des ovaires et du pancréas. L'utilisation d'inhibiteurs de la KLK7 pourrait donc constituer une approche prometteuse pour le traitement de certaines atteintes dermatologiques, et pour lutter contre la dissémination métastatique. Depuis deux décennies, plusieurs inhibiteurs synthétiques de cette isoforme ont été développés. Toutefois, la plupart de ces molécules présentent une sélectivité insuffisante, et sont dépourvues de propriétés physicochimiques adaptées à une utilisation *in vivo*. Ce travail de thèse est consacré à la synthèse d'inhibiteurs réversibles et sélectifs de la KLK7. A ce titre, deux séries de composés ont été explorées. La première est issue d'un criblage de molécules pyrido-imidazodiazépinones, qui a permis d'identifier un inhibiteur réversible et sélectif de la KLK7, le JMV4967 ($IC_{50} = 57,0 \mu M$). Ce composé se caractérise par la présence, en position 2 du cycle diazépique, d'un noyau phényle substitué en *ortho* par un groupement méthyle. Sur la base de ces résultats, une étude de relations structure-activité (SAR), a été initiée. Les meilleures inhibitions ont été obtenues avec les analogues du JMV4967 possédant en position 2 du cycle diazépique, un groupement 3,4,5-triméthoxyphényle ou 3,4-diméthoxyphényle. Cette étude a permis l'identification du composé JMV5046 ($IC_{50} = 33,5 \mu M$). Une étude biochimique du JMV5046, a mis en évidence son caractère réversible et compétitif vis-à-vis du substrat dans le site actif de la KLK7, comme le hit initial. La seconde série a été développée à partir d'une quinazoline substituée par un amino-benzimidazole, et une étude de RSA a également été menée. Finalement, une étude de réactivité chimique, a été également entreprise afin d'accéder à deux nouvelles séries de composés diazépiques fusionnés avec l'imidazo[1,2-*a*]pyridine ou l'indole. Cette étude a montré que la 2-amino-imidazopyridine pouvait subir une alkylation en position 3 du cycle, dans le cadre de la réaction de nitro-Michael. Les produits d'addition de Michael ainsi formés peuvent ensuite conduire, après réduction du groupement nitro, aux dérivés diazépiques correspondants. Par ailleurs, nous avons pu montrer que l'acylation du 2-amino-indole, en présence d'un donneur d'acyle de type ester activé d'acide aminé, conduisait aux dérivés N-acylés correspondants. Ces derniers ont été utilisés par la suite, pour la synthèse de dérivés indolodiazépiques *via* la réaction de cyclisation de Pictet-Spengler. La synthèse de ces composés, l'étude de leur activité inhibitrice sur la KLK7 sont décrites. Les expériences de modélisation moléculaire par docking *in silico*, permettant de préciser les bases structurales de l'inhibition de la KLK7 par le JMV5046, sont également présentées.

Mots-Clés : *Inhibiteurs d'enzymes, Kallikréines, Imidazopyridine, Diazépines, Pyrido-imidazo[1,3]diazépinones.*

Abstract

Human tissular kallikreins (KLKs) are members of (chymo)trypsin-like serine proteases, involved in various physiological pathways. Among the 15 known isoforms in the literature, kallikrein 7 (KLK7) plays a significant role in physiological and pathophysiological processes of the skin, like psoriasis and the Netherton syndrome. Several studies report also its implication in multiple processes leading to invasive and metastatic tumor growth, especially in prostatic, ovarian and pancreatic cancers. Strategies focused on KLK7 inhibition are a promising alternative for the treatment of such dermatological diseases, and to avoid metastatic dissemination. In the last two decades, many synthetic inhibitors of this KLK isoform have been developed. However, most of these molecules exhibit low selectivity and unsuitable physicochemical properties for *in vivo* use. This thesis is devoted to the synthesis of selective and reversible inhibitors of KLK7. Two series of compounds have been explored. The first one, derived from a screening of pyrido-imidazodiazepinones compounds, which led to the discovery of a reversible and selective inhibitor of KLK7, JMV4967 ($IC_{50} = 57.0 \mu M$). This compound is characterized by the presence of an *ortho* methyl substituted phenyl group, at position 2 of the diazepine ring. Based on these results, a structure-activity relationships (SAR) study was initiated. The best inhibitions were obtained with JMV4967analogs bearing a 3,4,5-trimethoxyphenyl or 3,4- dimethoxyphenyl group, at position 2 of the diazepine ring. This study led to the discovery of one compound, JMV5046 ($IC_{50} = 33.5 \mu M$). A biochemical study of JMV5046, highlighted its reversible and competitive behavior against the substrate in the KLK7 active site, as previously observed for the initial hit. The second series was developed from an amino-benzimidazole substituted quinazoline, and a SAR study was also carried out. A chemical reactivity study was also initiated to access two new series of imidazo[1,2-*a*]pyridine-fused or indole-fused diazepine compounds. This study showed that, 2-amino-imidazopyridine could undergo alkylation at position 3 of the ring, in the nitro-Michael reaction context. The obtained Michael adducts could then give, after reduction of the nitro group, the corresponding diazepine derivatives. We also showed that, in the presence of an acyl donor (as an activated amino acid ester), 2-amino-indole was *N*-acylated, unlike the 2-amino-imidazopyridine which leads to an exclusive *C*-acylation in the same conditions. The *N*-acylated derivatives were then used for the indolodiazepines synthesis, using Pictet-Spengler cyclization reaction. The synthesis of these compounds and their inhibiting activity against KLK7 are described. Molecular modeling experiments by *in silico* docking, to determine the structural requirements for KLK7 inhibition by JMV5046, are also presented.

Keywords : *Enzyme inhibitors, Kallikreins, Imidazopyridine, Diazepines, Pyrido-imidazo[1,3]diazepinones.*